

Análises de RNA, Proteínas e Metabólitos

Metodologia e Procedimentos Técnicos

Coordenadores
Rozangela **Verlengia**
Rui **Curi**
Estela **Bevilacqua**
Philip **Newsholme**





O GEN | Grupo Editorial Nacional reúne as editoras Guanabara Koogan, Santos, Roca, AC Farmacêutica, Forense, Método, LTC, E.P.U. e Forense Universitária, que publicam nas áreas científica, técnica e profissional.

Essas empresas, respeitadas no mercado editorial, construíram catálogos inigualáveis, com obras que têm sido decisivas na formação acadêmica e no aperfeiçoamento de várias gerações de profissionais e de estudantes de Administração, Direito, Enfermagem, Engenharia, Fisioterapia, Medicina, Odontologia, Educação Física e muitas outras ciências, tendo se tornado sinônimo de seriedade e respeito.

Nossa missão é prover o melhor conteúdo científico e distribuí-lo de maneira flexível e conveniente, a preços justos, gerando benefícios e servindo a autores, docentes, livreiros, funcionários, colaboradores e acionistas.

Nosso comportamento ético incondicional e nossa responsabilidade social e ambiental são reforçados pela natureza educacional de nossa atividade, sem comprometer o crescimento contínuo e a rentabilidade do grupo.

Análises de RNA,

Título: Análises de RNA, Proteínas e Metabólitos: Metodologia e Procedimentos Técnicos
Coordenadores: Rozangela Verlengia
Rui Curi
Estela Bevilacqua
Philip Newsholme
Revisão de texto: Maria Ofélia da Costa
Diagramação: Adriano Zago
Capa: Gilberto R. Salomão

Copyright © 2013 by
LIVRARIA SANTOS EDITORA LTDA.
Uma editora integrante do GEN | Grupo Editorial Nacional

Todos os direitos reservados à Livraria Santos Editora Com. Imp. Ltda. Nenhuma parte desta publicação poderá ser reproduzida sem a permissão prévia do Editor.

CIP-BRASIL. CATALOGAÇÃO-NA-FONTE
SINDICATO NACIONAL DOS EDITORES DE LIVROS, RJ

A551

Análises de RNA, proteínas e metabólitos: metodologia e procedimentos técnicos / Rozangela Verlengia... [et al.]
(coordenadores). - São Paulo: Santos, 2013.
454p. : il.; 28 cm

Inclui bibliografia
ISBN 978-85-7288-832-5

1. Ácido ribonucleico - Análise. 2. Ácido ribonucleico - Estrutura. 3. Ácido ribonucleico - Síntese. 4. Ácidos nucleicos. 5. Proteínas. 6. Biologia molecular. I. Verlengia, Rozangela.

11-0337. CDD: 572.88
CDU: 577.2

Nota do Editor

A nitidez e qualidade das imagens
de cada capítulo são de
responsabilidade de seus
respectivos autores.



Rua Dona Brígida, 701 | Vila Mariana
Tel.: 11 5080-0770 | Fax: 11 5080-0789
04111-081 | São Paulo | SP
www.grupogen.com.br

Coordenadores e Colaboradores

Ana Cristina Silva Rebelo

Professora Doutora
Universidade Federal de Goiás (UFG)
Departamento de Morfologia

Ana Maria de Lauro Castrucci

Professora Titular
Departamento de Fisiologia
Instituto de Biociências
Universidade de São Paulo, SP

Andréa Mollica do Amarante-Pafarro

Professora-adjunta
Departamento de Ciências Biomédicas
Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), MG

Anna Karenina Azevedo Martins

Professora Doutora
Escola de Artes, Ciências e Humanidades
Universidade de São Paulo, SP

Carla Cristine Kanunfre

Professora-adjunta
Departamento de Biologia Geral
Setor de Ciências Biológicas e da Saúde
Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR

Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia

Professora-associada-C
Departamento de Ciências Fisiológicas
Centro de Ciências Biológicas
Universidade Estadual de Londrina, PR

Claudia Costa Accorsi Pardi

Mestre em Ciências
Especialista na área de produtos relacionados à
Biologia Celular
Milipore, SP

Claudimara Ferini Pacicco Lotfi

Professora Doutora
Departamento de Anatomia
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade de São Paulo, SP

Claudio Miguel da Costa Neto

Professor Doutor
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo, SP

Cristóvão Alves da Costa

Pesquisador Titular
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Laboratório de Virologia Tropical
Manaus, AM

Daniel Giannella Neto

Professor Livre-docente
Laboratório de Gastroenterologia Clínica
e Experimental (LIM 07) do Hospital das Clínicas
Faculdade de Medicina
Universidade de São Paulo, SP

Dimas Augusto Morozin Zaia

Professor-associado-C
Departamento de Química
Centro de Ciências Exatas
Universidade Estadual de Londrina, PR

Elida Paula Benquique Ojopi

Pesquisadora
Laboratório de Neurociências
Hospital das Clínicas
Instituto e Departamento de Psiquiatria
Faculdade de Medicina
Universidade de São Paulo, SP

Eloiza Helena Tajara da Silva

Professora-adjunta
Departamento de Biologia Molecular
Faculdade de Medicina
São José do Rio Preto, SP

Emmanuel Dias-Neto

Pesquisador
Laboratório de Neurociências
Hospital das Clínicas
Instituto e Departamento de Psiquiatria
Faculdade de Medicina
Universidade de São Paulo, SP

Enrico Fuini Puggina

Professor Doutor
Escola de Educação Física e Esporte de
Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo, SP

Estela Bevilacqua

Professora Titular
Departamento de Biologia Celular e do
Desenvolvimento
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade de São Paulo, SP

Esther Piltcher Haber

Pesquisadora Doutora
Department of Internal Medicine
Hospital Hadassah
Hebrew University
Jerusalém, Israel

Fábio Daumas Nunes

Professor-associado
Departamento de Estomatologia
Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo, SP

Fernando Rodrigues de Moraes Abdulkader

Professor Doutor
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade de São Paulo, SP

Gisele Giannocco

Pesquisadora Doutora
Departamento de Morfologia e Fisiologia
Faculdade de Medicina do ABC, SP

Heraldo Possolo de Souza

Professor-associado
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina
Universidade de São Paulo, SP

Ivo Lebrun

Pesquisador Doutor
Laboratório de Bioquímica e Biofísica
Instituto Butantan, SP

José Edgar Nicoletti Carvalho

Doutor
Perito Criminal da Superintendência da
Polícia Técnico-científica
Estado de São Paulo, SP

Kelly Aparecida Kanunfre

Pesquisadora Doutora
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
Universidade de São Paulo, SP

Lorraine Brennan

Palestrante
UCD Conway Institute,
UCD School of Agriculture, Food Science and
Veterinary Medicine,
UCD, Belfield,
Dublin, Irlanda

Lúcia Rossetti Lopes

Professora Doutora
Departamento de Farmacologia
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade de São Paulo, SP

Luciana Chagas Caperuto

Professora Doutora
Departamento de Ciências Biológicas
Universidade Federal de São Paulo - Campus
Diadema, SP

Luciana dos Reis Vasques

Professora Doutora Colaboradora
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de São Paulo, SP

Luiz Claudio Godoy

Pesquisador Doutor
Massachusetts Institute of Technology
Cambridge, MA (EUA)

Mara Sandra Hoshida

Pesquisadora Doutora
Laboratório de Fisiologia Obstétrica - LIM57
Hospital das Clínicas
Faculdade de Medicina
Universidade de São Paulo, SP

Maria Lúcia Cardilho Corrêa Giannella

Professora Doutora do Departamento de
Clínica Médica da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo (FMUSP)
Pesquisadora do Laboratório de Endocrinologia
Celular e Molecular (LIM 25) do Hospital das
Clínicas
Faculdade de Medicina
Universidade de São Paulo, SP

Mário Hiroyuki Hirata

Professor Titular
Departamento de Análises Clínicas e
Toxicológicas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo, SP

Marisa D'Innocenzo

Doutora em Ciências
Gerente de Produtos
Roche Diagnóstica do Brasil Ltda.

Mariza Pires de Melo

Professora-associada
Departamento de Ciências Básicas
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de
Alimentos
Universidade de São Paulo, SP

Michael Murgu

Doutor em Química Orgânica
Gerente Técnico de Espectrometria de Massas
Waters Corporation Brasil

Miriam Rubio Faria

Doutora pelo Programa de Pós-graduação
Biologia Celular e Tecidual
Departamento de Biologia Celular e do
Desenvolvimento
Instituto de Ciências Biomédicas,
Universidade de São Paulo, SP

Moacir Cernelós Filho

Pesquisador Independente em Sensoriamento
Ambiental
Mestre em Biotecnologia
Instituto de Biomédicas
Universidade de São Paulo, SP

Patrícia Gama

Professora-associada
Departamento de Biologia Celular e do
Desenvolvimento
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade de São Paulo, SP

Patricia Severino

Pesquisadora Doutora
Centro de Pesquisa Experimental
Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa
Albert Einstein, SP

Philip Newsholme

Professor-associado
Metabolic Science
Conway Fellow
Head of Biochemistry
UCD School of Biomolecular and
Biomedical Science
UCD Conway Institute and Health
Sciences Complex
UCD Dublin
Irlanda

Renata Gorjão

Professora Doutora
Instituto de Ciências da Atividade Física e do
Esporte – ICAFE
Universidade Cruzeiro do Sul, SP

Rogério Fernandes de Souza

Professor-adjunto-D
Departamento de Biologia Geral
Centro de Ciências Biológicas
Universidade Estadual de Londrina, PR

Rosario Dominguez Crespo Hirata

Professora-associada
Departamento de Análises Clínicas e
Toxicológicas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo, SP

Rosemari Otton

Professora Titular
Instituto de Ciências da Atividade Física e do
Esporte – ICAFE
Universidade Cruzeiro do Sul-SP

Rozangela Verlengia

Professora Doutora
Programa de Pós-graduação em Educação Física
Faculdade de Ciências da Saúde
Universidade Metodista de Piracicaba,SP

Rui Curi

Professor Titular
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade de São Paulo, SP

Sandro Massao Hirabara

Professor Doutor
Instituto de Ciências da Atividade Física e do
Esporte – ICAFE
Universidade Cruzeiro do Sul-SP

Silvana Marina Piccoli Pugine

Especialista de Laboratório
Departamento de Ciências Básicas
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de
Alimentos
Universidade de São Paulo, SP

Sonia Quateli Doi

Nephrology Research Laboratory
Department of Medicine
Uniformed Services University of the Health
Sciences, USA

Valdemar Antonio Paffaro Junior

Professor-adjunto
Departamento de Ciências Biomédicas
Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), MG

Agradecimentos

Muitas pessoas participaram ativamente na elaboração deste livro. Os autores querem expressar seus profundos agradecimentos a todos eles. Agradecemos, portanto, aos colaboradores que abraçaram conosco este ideal desenvolvendo as atividades com dedicação e solicitude, e pela paciência na observância dos objetivos propostos.

Agradecimentos especiais ao Sr. Rui Santos, por acreditar em nosso trabalho e permitir a materialização deste ideal, e a todos os funcionários da Editora Santos e do Grupo GEN – Grupo Editorial Nacional, pelo empenho, atenção e profissionalismo.

Agradecimentos especiais à Profa. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata, pela colaboração imprescindível na finalização do texto.

Por sua assistência técnica na maioria das ilustrações, agradecemos ao Leandro Bevilacqua, bem como a Cristina Carnelós (ilustrações dos Capítulos 17 e 21) e Guanis de Barros Vilela Junior (ilustrações dos Capítulos 6 e 13).

Obrigada também aos nossos mestres e professores que foram responsáveis pela nossa formação, que influenciaram nosso desenvolvimento profissional e nos ensinaram a importância da ciência na formação de uma nação.

Finalmente, agradecemos à Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar, pelo trabalho pioneiro em cultura de células no Brasil e sua contribuição imprescindível no aprimoramento e formação do patrimônio científico do Brasil, uma inspiração constante para os autores.

Lista de Abreviaturas

α = alfa	CHAPS = 3-[(3-colamidopropil)dimetil-amônio]-1-propanosulfonato
γ = gama	CLAD = Cromatografia líquida de alto desempenho
α -MM = 2-Metil-D-manosídio	CLAE = Cromatografia líquida de alta eficiência
ρ -NTP = ρ -Nitrofenol fosfato	CMV = Citomegalovírus
^{32}P = Fósforo – 32	CN = 4 – cloro – 1 – naftol
^{33}P - Fósforo = 33	CN = Íon cianeto
4' = AMDMIP – 4' - Aminometil – 4, 5 – dimetil – isopsoraleno	CNBr = Brometo de cianôgeno
A = Adenina	CNEM = Comissão Nacional de Energia Nuclear
ABC = Complexo avidina-biotina	CPRG = vermelho de clorofenol β -D-galactopiranosídeo
ABTS = 2,2-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)	CuZn-SOD = Superóxido dismutase dependente de cobre-zinco
ACN = Acetonitrila	DAB = 3, 3' - Tetraidrocloro de diaminobenzidina
ACTB = β -Actina	DAN = 2,3 – Diaminonaftaleno
ADP = Adenosina Difosfato	DAF-2 = 4,5-Diaminafluoresceína
AEBSF = Aminoetil benzilsulfonil fluoreto	DAPI = 4', 6 – Diamidino – 2 – fenilindol
AEC - 2,3 = Amino-9- etilcarbazol	dATP = Desoxirribonucleotídeo adenilato
ALP = Fosfatase alcalina	DCI = Dicloisocomarim
AP = Apurínicos/Apirimidínicos	dCTP = Desoxirribonucleotídeo citidilato
APAAP = Fosfatase-alcalina-antifosfatase	DEPC = Dietilpirocarbonato
APC = Aloficocianina	DETA-NONOato = 1-[2-(2-aminoetil)-N-(2-amônioetil) amino] diazen -1 – ium, 2-diolato
APOB = Apolipoproteína-B	DFP ou DipF = Diisopropilfosfofluoridrato
APS = Persulfato de amônio	dGTP = Desoxirribonucleotídeo guanilato
AMPPD = 3-(4-Metoxispiro { 1,2 -dioxetano-3,2' – tríciclo [3.3.1.1 ^{3,7}] decan}-4-il) fenilfosfato dissódico-3 ou 3-[2' espiroadamantana]-4-metoxi-4-[3''-(fosforiloxi)fenil]-1,2-dioxetano ou 3-(4-metoxispiro[1,2-dioxetane-3,2''-tríciclo-[3.3.1.1 ^{3,7}] decan]-4-il)-fenilfosfato dissódico	DIG = Digoxigenina
ATP = Adenosina trifosfato	DIPF = Diisopropilfosfofluoridrato
BBTP = 2' - [2-Benzotiazolil] - 6' - hidroxibenzotiazol fosfato	DMF = Dimetilformamida
BCIP = 5-Bromo-4-cloro-3 indolil fosfato	DMSO = Dimetilsulfóxido
Biotina – HPDP = N-[6- (biotinamido) hexil]-3' - (2'-piridilditio) propionamida	DNA = Ácido desoxirribonucleico
BrdU = 5 – Bromo – 2' - dioxiuridina	dNTP = Desoxirribonuceotídeos
BSA = Albumina sérica bovina	DO = Densidade óptica
C = Citosina	dsDNA = DNA de dupla fita
Cap G = Capacete G	dsRNA = RNA de dupla fita
CaWO ₄ = Tungstato de cálcio	DTE = Ditioeritol
CD = <i>Cluster of differentiation</i>	DTT = Ditiotreitrol
CDD = Câmara com dispositivo associado a carga	dTTP = Desoxirribonucleotídeo timidilato
cDNA = DNA complementar	dUTP = 2' - Desoxirribonucleotídeo uridilato
CE = Concentração efetiva	EDTA = Ácido etilenodiaminotetracético
	eIFs = Fatores de iniciação
	ELISA = Ensaio imunoabsorvente ligado a enzima
	EMSA = Ensaio de alteração (retardamento) de mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida
	EPIs = Equipamentos de proteção individual

EPR = Ressonância paramagnética eletrônica
 ESTs = Sequência *tags* expressas
 FACS = Citometria de fluxo
 FAD = Flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
 FITC = Fluoresceína
 FPLC = Cromatografia líquida rápida de proteína
 G = Guanina
 G6PDH = Glicose 6-fosfato-desidrogenase
 GAPDH = Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
 GPI = Glicosilfosfatidilinositol
 GPx = Glutathione peroxidase
 GR = Glutathione reductase
 GSH = Glutathione reduzida
 GSNO = S-nitrosoglutathione
 GSSG = Glutathione oxidada
 GTP = Trifosfato de guanosina
 H₂O₂ = Peróxido de hidrogênio
 HCl = Ácido clorídrico
 He-Ne = Laser heliônio
 HgCl₂ = Cloreto de mercúrio
 HIV = Vírus da imunodeficiência humana
 HNPP – Fosfato 2 = Hidroxi – 3 ácido naftoico 2'-fenilamida fosfato
 hnRNA = RNA heteronuclear
 HOPPA = Ácido – 2 -amino 3-(p-hidroxifenil) propiônico
 HPLC = Cromatografia líquida de alto desempenho
 HRP = Peroxidase de rabanete
 HSP = Proteína de choque térmico
 IEF = Focalização isoeletrica
 IMP = inosina monofosfato
 Kb = Quilobases
 Mg²⁺Cl = Cloreto de magnésio
 MMP = Metaloproteases da matriz extracelular
 MMTS = Metilmetanotiosulfato
 Mn-SOD = Superóxido dismutase dependente de magnésio
 MOPS = Ácido 3-(N-morfolino)-propano-sulfônico
 Mr = Massa molecular relativa
 mRNA = RNA mensageiro
 m/v = massa/volume
 N₂O₃ = Trióxido de dinitrogênio
 NADPH = Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
 NAG = N- Acetilglicosamina
 NAM = Ácido N-acetilmurâmico
 NaOH = Hidróxido de sódio
 NBT = Nitroazul de tetrazólio ou Cloreto de tetrazólio nitroazul
 NEM = N-Etilmaleimida
 NO = Óxido nítrico
 NO₂ = Nitrito

nt = Nucleotídeo
 NTMT = Solução de cloreto de sódio –Tris-HCl-Mg²⁺Cl – *tween*
 NTP = Ribonucleotídeos
 O₂ = Ânion superóxido
 ODN – Oligodeoxinucleotídeo
 OH- = Grupo hidroxila
 ONPG = Orto-nitrofenil β-D-galactopiranosídeo
 OPD = Diidrocloreto o-Fenilenodiamina
 PA = Pró-análise
 PAB = Biotina fotoatível
 PABP = Proteína de ligação à cauda de poli (A)
 PAP = Peroxidase-antiperoxidase
 pb = Pares de bases
 PBMC = Célula mononucleada de sangue periférico
 PBS = Tampão fosfato salina
 PBSA = Tampão fosfato tamponado sem cálcio e magnésio
 PC = Piruvato carboxilase
 PCR = Reação em cadeia pela polimerase
 PDH = Piruvato desidrogenase
 PerCP = Pirinidina clorofil
 PAGE/SDS = Eletroforese em gel de poliacrilamida com sulfato de sódio dodecila
 PHP = Proteína histidina fosfatase
 PHPA = ácido p-Hidroxifenilacético
 PI = fosfatidilinositol-3-quinase
pI = Ponto isoeletrico
 PI-4P = Fosfatidilinositol-4-5-difosfato
 PLP = Paraformaldeído-lisina-periodato
 PMSF = Fluoreto de p-ferinilmetilsulfonila ou Fluoreto de p-ferinilmetilsulfonil
 PMT = Fotomultiplicador
 pNPP = p-nitrofenol fosfato
 ppm = Partes por milhão
 PPM = Proteínas fosfatases estimuladas por Mg²⁺
 PPP = Fosfoserina/fosfotreonina proteína fosfato
Primer = Oligonucleotídeo iniciador
 PSer = Fosfoserina
 PTB = Tampão fosfato + *tween*
 PTGS = Silenciamento gênico pós-transcricional
 PTH = Fenilisotiocianato de potássio
 PThr = Fosfotreonina
 PTP = Fosfotirosinas fosfatases
 PTyr = Fosfotirosina
 PVC = Cloreto de polivinila
 PVDF = Difluoreto de polivinilideno
 PVPP = Polivinil pirrolidona
 RE = Retículo endoplasmático
 RER = Retículo endoplasmático rugoso
 RISC = Complexo de silenciamento induzido por RNA

RM = Ressonância magnética	T = Timina
RMN = Ressonância magnética nuclear	TA = Temperatura ambiente
RNA = Ácido ribonucleico	TBE = Tampão Tris-ácido bórico-EDTA
RNA-AS = RNA- <i>antisense</i>	TBP = Proteína de ligação TATA
RNAi = RNA interferente	TBST = Tampão Tris-salina + <i>tween</i>
RNP = Ribonucleoproteína	TCA = Ácido tricloroacético
rNTPs = Ribonucleosídeo 5' - trifosfato	TE = Tampão Tris-EDTA
RPA = Ensaio de proteção a ribonuclease	TEMED = N,N,N', N' - tetrametiletilenodiamina
R-PE = R-Ficoeritrina	TF = Fatores de transcrição
rRNA = RNA ribossômico	TFII D = Fator de transcrição II D
ROX = Carboxi-x-rodamina	TLC = Cromatografia de camada delgada
RT = Transcriptase reversa	TLCK = Clorometilcetona de N- α -p-tosil-L-lisina
RT-PCR = Transcrição reversa – reação em cadeia pela polimerase	T _m = Temperatura de dissociação/Temperatura de desnaturação
S = Enxofre	TMB = 3, 3', 5, 5' - tetrametilbenzidina
SAGE = Análise seriada da expressão gênica	TPCK = Cromometilcetona de tosil-L-fenilalanina
SDS = Sulfato de sódio dodecila	TRF-1 = Fator de ligação de repetição telomérica-1
SDS-PAGE = Eletroforese em gel de poliacrilaminada – sulfato de sódio dodecila	TRF-2 = Fator de ligação de repetição telomérica 2
SFB = Soro fetal bovino	Tris-HCl = Hidrocloreto de tris (hidroximetil) aminometano
-SH = grupo tiol	tRNA = RNA transportador
siRNA = Pequenos RNA interferentes	U = Uracila
SNAP = S-nitroso-N-acetilpenicilamina	UI = Unidade internacional
S-NO = S-nitrosotióis	UNG = Uracila N-glicosilase
snRNA = Pequenos RNA nucleares	UTP = Ribonucleotídeo uridilato ou uridina trifosfato
SOD = Superóxido dismutase	UTRs = Sequências não codificadoras
SSB = Proteínas de ligação a fita simples	UV = Ultravioleta
SSC = Solução de cloreto de sódio e citrato de sódio	Vis = Visível
ssDNA = DNA de fita simples	VRC = Complexo vanidil ribonucleosídeo

Informações Gerais

Água ultrapura – obtida por meio de sistema de osmose reversa e troca iônica

Bq – Becquerel – unidade de medida no sistema internacional (SI) para radiatividade

m/v – massa/volume

mer – denominação do comprimento, em número de bases de um oligonucleotídeo de fita simples do DNA

p/v – peso/volume

PAGE/SDS – eletroforese em gel de poliacrilamida com sulfato de sódio dodecila

q.s.p. – quantidade suficiente para

rpm – revoluções por minutos

v/v – volume/volume

x g – múltiplos da aceleração da gravidade no nível do mar; quantas vezes a amostra está sendo acelerada em relação a gravidade na superfície da Terra (Azevedo, 2003)

Prefácio

No livro estão descritas as propriedades químicas e estruturais de ácidos nucleicos e proteínas que permitem sua manipulação. Também, apresenta as principais técnicas que possibilitam investigar mecanismos moleculares associados aos processos de transcrição e síntese de proteínas.

Um conjunto de conhecimentos que se encontram espalhados em diversos artigos e publicações está aqui apresentado de maneira didática, permitindo responder a perguntas relevantes sobre a manipulação molecular das células e suas aplicações. Neste contexto, o livro contempla conteúdos sobre transcriptoma, proteoma e metaboloma. O transcriptoma possibilita estudar a expressão dos genes em resposta às mudanças no meio ambiente, sejam elas nutricionais, patológicas ou até mesmo decorrentes da administração de drogas. O proteoma analisa o produto dos genes (as proteínas). O objetivo do proteoma é compreender e explicar as informações contidas no genoma para elucidar os eventos celulares, como, por exemplo, aqueles relacionados à etiologia de doenças. O metaboloma, por sua vez, é o estudo da concentração dos metabólitos da célula ou do organismo como um todo e suas alterações em resposta a doenças, dietas ou mudanças ambientais, por exemplo.

O livro aborda a célula enfatizando sua função e composição química. Cada temática é seguida por um conjunto de técnicas discutidas quanto aos seus fundamentos teóricos de forma aprofundada e possíveis aplicações. Contempla ainda a descrição da estrutura e propriedades dos ácidos nucleicos seguida de metodologias frequentemente utilizadas para a investigação destas moléculas. Descreve-se a origem, obtenção, estrutura e propriedades das proteínas e seus métodos usuais de análise. Os conhecimentos assim adquiridos interagem buscando entender e interferir nas respostas dos organismos frente a estímulos diversos e se complementam com estudos da concentração dos metabólitos celulares.

É um texto dirigido para pesquisa e diagnóstico, integrando diferentes áreas, tais como: Biologia, Microbiologia, Imunologia, Virologia, Medicina, Biomedicina, Veterinária e Farmácia. O texto pode ser usado por alunos de iniciação científica, pós-graduandos, pós-doutorandos e pesquisadores experientes. Pode ser de enorme utilidade para profissionais que trabalham em laboratórios clínicos e hospitalares, bancos de sangue, indústrias de biotecnologia, laboratórios de diagnóstico de doenças infecciosas e institutos de criminalística (forense). Desta maneira, este livro atende as mais diferentes áreas que fazem uso desse conhecimento. A abordagem didática na apresentação dos mecanismos envolvidos nos processos biológicos e nas técnicas laboratoriais permite que os profissionais interessados possam implantá-las e desenvolvê-las com conhecimentos sólidos.

Os Coordenadores

Sumário

Capítulo 1	
Biologia da Célula.....	1
Capítulo 2	
Estrutura e Propriedades dos Ácidos Nucleicos.....	9
Capítulo 3	
Tecnologia de Detecção de Ácido Nucleico.....	29
Capítulo 4	
Extração de Ácidos Nucleicos em Amostras Biológicas: Reagentes e suas Aplicações.....	39
Capítulo 5	
Separação e Identificação de Ácidos Nucleicos e Proteínas por Eletroforese	47
Capítulo 6	
Avaliação da Expressão de RNA Mensageiro por <i>Northern Blotting</i>	59
Capítulo 7	
Análise da Expressão Gênica por <i>Microarrays</i> de DNA	73
Capítulo 8	
Análise da Expressão Gênica por Ensaio de Proteção a Ribonuclease.....	83
Capítulo 9	
Sistema de Amplificação de Ácidos Nucleicos pela Reação em Cadeia de Polimerase	95
Capítulo 10	
Sistema de Amplificação de Ácidos Nucleicos por PCR em Tempo Real.....	109
Capítulo 11	
Prevenção da Contaminação nas Reações de Amplificação de Ácidos Nucleicos	123
Capítulo 12	
Análise da Expressão Gênica por meio da Técnica de SAGE (<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>).....	131
Capítulo 13	
Repressão da Expressão Gênica em Células em Cultura pela Tecnologia <i>Antisense</i>	157
Capítulo 14	
RNA Interferente como Método para Inativação Gênica.....	167
Capítulo 15	
Análise da Expressão Gênica nas Células e Tecidos: Hibridação <i>In Situ</i> Não Radioativa	181
Capítulo 16	
Proteínas e a Origem da Vida.....	191
Capítulo 17	
Estrutura e Propriedades das Proteínas	199
Capítulo 18	
Manipulando as Proteínas <i>In Vitro</i>	207

Capítulo 19	
Espectrofotometria para Análise de Proteínas Totais	217
Capítulo 20	
Determinação Espectrofotométrica de Proteínas Totais.....	223
Capítulo 21	
Imunoensaio Enzimático para Detecção de Proteínas.....	235
Capítulo 22	
Identificação de Proteínas por Imunoprecipitação	243
Capítulo 23	
Identificação de Proteínas por <i>Western Blotting</i>	249
Capítulo 24	
Identificação das Proteínas por meio da Eletroforese 2D	261
Capítulo 25	
Análise de Expressão de Proteínas Celulares Usando Técnica de Citometria de Fluxo.....	281
Capítulo 26	
Identificação de Proteínas por Imunoistoquímica	293
Capítulo 27	
Análise Proteômica: Identificação de Proteínas Extraídas de Géis de Eletroforese Bidimensional Utilizando a Espectrometria de Massas	309
Capítulo 28	
HPLC – para Isolamento e Identificação de Compostos.....	325
Capítulo 29	
HPLC – para Análise de Aminoácidos	339
Capítulo 30	
Detecção de Proteínas Glicosiladas.....	351
Capítulo 31	
Identificação de Proteínas Fosforiladas.....	359
Capítulo 32	
Detecção de Proteínas S-Nitrosiladas	365
Capítulo 33	
Análise de Fosfopeptídeos e Fosfoaminoácidos em Cromatografia de Camada Delgada (TLC).....	375
Capítulo 34	
Análise das Proteínas Ligadoras de DNA por Ensaio de Alteração de Mobilidade Eletroforética em Gel de Poliacrilamida (EMSA)	389
Capítulo 35	
Análise da Atividade Enzimática	403
Capítulo 36	
Análise do Metabolismo de Células de Mamíferos Usando Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	415
Índice Remissivo	423

1. Biologia da Célula

Philip Newsholme

Introdução

As células são as menores estruturas capazes de realizar os processos básicos da vida, tais como utilizar nutrientes, expelir os produtos do metabolismo e reproduzir-se. Todos os seres vivos do planeta Terra são compostos por células. Alguns organismos microscópicos, como as bactérias e os protozoários, são unicelulares, isto é, são constituídos de uma única célula. Plantas, animais e fungos são multicelulares, isto é, são compostos por um grande número de células que trabalham em conjunto. Uma célula pode ser uma única bactéria ou uma em trilhões no ser humano, porém, com arquitetura e eficiência surpreendente. As células executam milhares de reações bioquímicas a cada minuto e produzem novas células que perpetuam a vida.

O tamanho das células varia consideravelmente. A menor, um tipo de bactéria conhecido como micoplasma, mede 0,0001 mm de diâmetro. Isto significa que 10.000 micoplasmas enfileirados têm somente a largura de um fio de cabelo humano. Entre as maiores estão as células nervosas do pescoço de uma girafa. Essas células podem exceder os 3 metros (9,7 ft) em comprimento. As células humanas também possuem uma variedade de tamanhos, desde as menores células do sangue, que medem 0,00076 mm, até as células do fígado, que podem ser dez vezes maiores. Cerca de 10.000 células humanas de tamanho médio podem caber em uma cabeça de alfinete.

Juntamente com suas diferenças de tamanho, as células têm uma variedade de formas. Algumas, assim como a bactéria *Escherichia coli*, assemelham-se a hastes. O *Paramecium*, um tipo de protozoário, é fino, longo e escorregadio; a *Ameba*, outro protozoário, tem forma irregular e muda de forma conforme se movimenta. As células das plantas assemelham-se tipicamente a caixas ou a cubos. Em seres humanos, as células da camada mais externa da pele são achatadas, enquanto as mus-

culares são longas e finas. Algumas células nervosas possuem extensões semelhantes a tentáculos alongados altamente especializados.

Em organismos multicelulares, o formato das células é definido de acordo com a função que elas exercem. Por exemplo, as células da pele, achatadas e compactadas em camadas, protegem os tecidos subjacentes da invasão de bactérias. Longas e finas, as células musculares contraem-se em tamanho para movimentar os ossos. As inúmeras extensões de uma célula nervosa capacitam-na a conectar-se com várias outras células nervosas para que possam enviar e receber mensagens rápida e eficientemente.

Uma única célula é um modelo de independência e autocontrole. A célula realiza trocas constantemente, movimenta-se e transporta moléculas essenciais de um lugar a outro para executar as funções necessárias à vida. Apesar de suas individualidades, elas, de modo geral, apresentam uma grande habilidade de se agrupar, comunicar e de interagir com outras células. O corpo humano, por exemplo, é constituído de cerca de 20 a 30 trilhões de células. Diferentes tipos de células são organizados em grupos especializados, denominado de tecido. Tendões e medula, por exemplo, são compostos por tecido conjuntivo, já a pele e as membranas mucosas são constituídas de tecido epitelial. Diferentes tipos de tecidos são agrupados, formando os órgãos. Esses órgãos são estruturas organizadas que executam funções particulares. Exemplos de órgãos incluem: coração, estômago e cérebro. Os órgãos, por sua vez, são organizados formando sistemas, tais como o circulatório, digestório, endócrino, imunológico e o nervoso. Todos os sistemas juntos formam o corpo humano.

Os componentes das células são as moléculas, estruturas não vivas, formadas pela união de átomos. Pequenas moléculas servem como blocos de construção para moléculas maiores. Proteínas, ácidos nucleicos, carboi-

dratos e lipídios (fosfolipídios e triacilgliceróis) são as quatro principais moléculas que suportam as estruturas e participam das funções celulares. Por exemplo, um arranjo firmemente organizado de lipídios, proteínas e compostos complexos de proteína-açúcar formam a membrana plasmática, ou o limite externo de muitas células. As organelas, compartimentos circundados por membranas que estão no interior das células, são constituídas de lipídios e proteínas. Reações bioquímicas nas células são aceleradas por ação de enzimas, proteínas especializadas que catalisam as reações químicas. O ácido desoxirribonucleico (DNA) contém as informações hereditárias das células, e outro ácido nucleico, o ácido ribonucleico (RNA), age com o DNA para decodificar e determinar a sequência de aminoácidos de milhares de proteínas necessárias às células.

Estrutura Celular

As células são classificadas em duas categorias: procariótica ou eucariótica. Em uma célula procariótica, bactéria e arqueobactéria, todos os componentes, incluindo o DNA, misturam-se livremente no seu interior. Células eucarióticas, que formam plantas, animais, fungos e todas as outras formas de vida, contêm numerosos compartimentos, ou organelas, no interior de cada célula. O DNA em células eucarióticas é encapsulado em uma organela especial chamada de núcleo, que serve como centro de controle da função celular e armazenamento de informações. O termo procariótico origina-se do grego, que significa “antes do núcleo” ou “pré-núcleo”, enquanto *eucariótica* significa “núcleo verdadeiro”.

Células Procarióticas

As células procarióticas estão entre as menores de todas as células, variando em tamanho de 0,0001 a 0,003 mm de diâmetro. Aproximadamente 100 células procarióticas enfileiradas em uma coluna igualariam à espessura de uma folha de livro. Essas células, que podem ser em forma de hastes, esféricas ou espirais, são circundadas por uma parede celular protetora. Como a maioria das células, as procarióticas vivem em meio aquoso, como em solo úmido, lago, ou fluidos circundando as células do corpo humano. Poros minúsculos na parede celular possibilitam que a água e substâncias nela dissolvidas, como o oxigênio, fluam para o interior da célula. Esses poros também permitem que os resíduos metabólicos saiam da célula.

Abaixo da parede celular fica uma fina membrana, denominada de membrana plasmática. Esta é

constituída de duas camadas de moléculas de lipídios flexíveis e intercalados com proteínas, também flexíveis e fortes. Ao contrário da parede das células em que os poros abertos permitem o transporte irregular de materiais para dentro e fora da célula, a membrana plasmática é seletivamente permeável, isto é, permite apenas a passagem de certas moléculas. Desse modo, a membrana plasmática separa ativamente o conteúdo da célula de seu meio externo.

Enquanto pequenas moléculas como água, oxigênio e dióxido de carbono difundem-se livremente através da membrana plasmática, a passagem de moléculas maiores, incluindo os aminoácidos (blocos de construtores das proteínas) e açúcares, é cuidadosamente regulada. Proteínas transportadoras especializadas realizam essas tarefas. As proteínas transportadoras estão na membrana plasmática, formando um complexo sistema de bombas e canais através dos quais ocorre o transporte de metabólitos. Algumas substâncias encontradas nos fluidos ao redor somente podem entrar na célula através do transporte específico mediado por uma proteína transportadora. Dessa forma, as células regulam seu meio interno mantendo-o constante.

A membrana plasmática engloba o citoplasma, um semifluido que preenche o interior da célula. Composto por 65% de água, o citoplasma apresenta bilhões de moléculas, um meio rico que inclui enzimas e nutrientes dissolvidos. A água cria um ambiente favorável para milhares de reações bioquímicas que acontecem no interior da célula.

O DNA encontra-se no citoplasma de todas as células procarióticas. Essa é uma molécula complexa composta de dupla hélice (ver Capítulo 2). O DNA tem cerca de 1.000 vezes o comprimento da célula, e para que fique em seu interior, se torce repetidamente e se dobra, para formar uma estrutura compacta chamada cromossomo. O cromossomo nas células procarióticas é circular e está localizado em uma região da célula chamada nucleóide. Frequentemente, cromossomos menores chamados de plasmídeos estão localizados no citoplasma. O DNA é dividido em unidades chamadas genes que, como um longo trem, é dividido em vagões. Dependendo da espécie, o DNA contém centenas ou até milhares de genes. Um gene contém instruções codificadas para a construção de todas ou parte de uma proteína. As enzimas, que são proteínas especializadas, determinam virtualmente todas as reações bioquímicas que mantêm as funções das células.

As únicas organelas de uma célula procariótica, que são minúsculos grânulos chamados ribossomos também estão imersas no citoplasma. Estes são os locais de

síntese de proteínas da célula. Seguindo as instruções do código genético do DNA, os ribossomos produzem centenas de cópias das proteínas por minuto, formando enzimas, proteínas transportadoras ou outras proteínas requeridas pelas células.

A extraordinária diversidade bioquímica de uma célula procariótica é manifestada pelo amplo estilo de vida das cianofíceas e das bactérias, cujo *habitat* inclui as regiões polares, desertos, regiões de passagens hidrotérmicas e nas profundezas dos oceanos sob grande pressão, onde nascentes de água quente (*geysers*) entram em erupção a partir das rachaduras existentes no fundo do oceano.

Células Eucarióticas de Animais

Células eucarióticas são dez vezes maiores do que células procarióticas. Nas células animais, a membrana plasmática, em vez da parede celular, formam os limites externos da célula. Com um formato similar ao da membrana plasmática de uma célula procariótica, a membrana plasmática separa a célula daquilo que a rodeia e regula o tráfego molecular.

O citoplasma das células eucarióticas é similar ao das células procarióticas, com exceção de uma diferença importante: as células eucarióticas abrigam um núcleo e numerosas outras organelas envolvidas por membrana. Como escritórios em uma empresa, essas organelas desempenham funções especializadas eficientemente. A síntese de proteínas e lipídios, por exemplo, acontece em organelas diferentes, onde estão localizadas enzimas específicas.

O núcleo é a maior organela da célula animal. Ele contém numerosos filamentos de DNA, sendo o comprimento de cada filamento várias vezes maior que o diâmetro da célula. Ao contrário do DNA circular da célula procariótica, as longas fitas de DNA eucarióticas agregado dentro do núcleo estão envolvidas por proteínas. Quando a célula começa a se dividir, cada filamento de DNA dobra-se sobre si mesmo várias vezes, formando um cromossomo de forma achatada.

O núcleo é rodeado por uma membrana de camada dupla que protege o DNA dos possíveis danos das reações químicas que ocorrem no citoplasma. Mensagens passam do citoplasma para o núcleo através dos poros nucleares, que são orifícios existentes na membrana do núcleo. Em cada poro nuclear, sinais moleculares aparecem (piscam) em um vaivém, a quase dez vezes por segundo. Por exemplo, um sinal para ativar um gene específico chega ao núcleo e a informação para a produção da proteína correspondente vai para o citoplasma.

Acoplado à membrana nuclear existem bolsas membranosas achatadas chamadas de retículo endoplasmático. Essa organela forma tubos no interior do citoplasma, dobrando-se em torno de si, formando um amontoado membranoso. Existem duas formas de retículo endoplasmático: o rugoso e o liso. O retículo endoplasmático rugoso (RER) é assim chamado porque contém ondulações, visto ao microscópio. Essas ondulações são, na realidade, milhares de ribossomos ancorados na superfície da membrana. Os ribossomos das células eucarióticas têm a mesma função daqueles das células procarióticas, a síntese de proteína, mas com uma pequena diferença na estrutura. Esses ribossomos ancorados ao retículo endoplasmático ajudam a sintetizar as proteínas exportadas da célula. Os ribossomos atuam em conjunto com outras moléculas para ligar os aminoácidos às proteínas parcialmente sintetizadas. As proteínas ainda incompletas vão para a cavidade interna do retículo endoplasmático, onde modificações químicas como adição de açúcar ocorrem. As modificações químicas dos lipídios também ocorrem no retículo endoplasmático.

O retículo endoplasmático e seus ribossomos são particularmente abundantes nas células que produzem muita proteína para exportação, tais como os plasmócitos, que produzem e secretam anticorpos. Alguns ribossomos não estão ancorados no retículo endoplasmático, mas também produzem proteínas. Esses são chamados ribossomos livres, estão dispersos no citoplasma e produzem proteínas, em geral enzimas, que permanecem nas células.

O segundo tipo de retículo endoplasmático é o liso, que não possui ribossomos e tem superfície lisa. No interior dos canais espirais do retículo endoplasmático estão as enzimas necessárias para a síntese de macromoléculas como carboidratos e lipídios. O retículo endoplasmático liso é abundante nas células do fígado, em que também é importante para metabolizar e eliminar substâncias como álcool, drogas e venenos.

As proteínas são transportadas a partir dos ribossomos livres e aqueles ancorados no RER para o complexo de Golgi. Esta organela lembra um amontoado de bexigas murchas, repleta de enzimas que completam o processamento das proteínas. Essas enzimas adicionam átomos de fósforos e enxofre a certas regiões das proteínas, por exemplo, ou removem suas porções terminais. A proteína completa deixa, então, o complexo de Golgi para seu destino final no interior ou fora da célula. Durante seu processamento no ribossomo, cada proteína é alongada com um peptídeo de 4 a 100 ami-

noácidos chamado de sinal. O peptídeo sinal atua como uma molécula de transporte que direciona as proteínas para locais específicos da célula.

Os lisossomos são pequenas organelas esféricas que atuam como centro de reciclagem e “lixreira”. Enzimas digestivas presentes no lisossomo degradam organelas com função comprometida e transportam seus blocos constitutivos para o citoplasma onde são usados na produção de novas organelas. Lisossomos também desintegram e reciclam proteínas, lipídios e outras moléculas.

As mitocôndrias constituem o local principal de produção de energia na célula. Essas organelas podem parecer ovais ou em forma de feijão ao microscópio eletrônico. No interior dessas longas e delgadas organelas, enzimas convertem moléculas simples contendo carbono, hidrogênio e oxigênio em adenosina trifosfato (ATP). Essa molécula fornece a energia para que os processos celulares ocorram como o transporte de substâncias através da membrana plasmática, a síntese e o transporte de proteínas e lipídios, a reciclagem de moléculas e organelas e a divisão celular. As células musculares e hepáticas são muito ativas e requerem centenas de mitocôndrias para suprir sua demanda energética. As mitocôndrias são diferenciadas, pois contêm DNA na forma de cromossomos circulares, como as células procarióticas, e possuem seus próprios ribossomos e dividem-se independentemente da célula. As mitocôndrias apresentam proteínas que são produzidas a partir do DNA mitocondrial e outras que são importadas do citoplasma e sintetizadas a partir do DNA nuclear.

As células eucarióticas relativamente grandes requerem suporte estrutural. O citoesqueleto é uma rede dinâmica de tubos proteicos, fibras e filamentos que cruzam o citoplasma, ancorando as organelas em lugares apropriados, fazendo com que as células adquiram sua forma e estrutura. Muitos componentes do citoesqueleto são unidos e separados conforme as necessidades da célula. Alguns deles (microfilamentos) servem como trilhas microscópicas, nas quais proteínas e outras moléculas “viajam” como se fossem minitrens.

Células Eucarióticas das Plantas

As células das plantas têm todos os componentes de uma célula animal, porém, existem algumas estruturas adicionais como cloroplastos, vacúolo central e parede celular. Os cloroplastos convertem energia luminosa, a partir do sol, em açúcar, em um processo conheci-

do como fotossíntese. Os cloroplastos, assim como as mitocôndrias, possuem cromossomos circulares e ribossomos como nos procariotos, os quais produzem as proteínas que os cloroplastos precisam.

O vacúolo central de uma célula madura ocupa a maior parte desta. O vacúolo, um saco membranoso, empurra o citoplasma e as organelas para a borda da célula. O vacúolo central estoca água, sais, açúcares, proteínas e outros nutrientes. Em adição, também estoca pigmentos de cor azul, vermelha e roxa que dão às flores suas colorações. Além disso, o vacúolo contém resíduos de gosto amargo para certos insetos, desencorajando-os de se alimentarem das plantas.

Nas células das plantas, uma parede celular resistente circunda e protege a membrana plasmática. Seus poros possibilitam que materiais passem livremente de fora para dentro das células e vice-versa. A força da parede também permite à célula absorver água para o interior do vacúolo central que se avoluma sem estourar. O resultado da pressão na célula provê as plantas com rigidez e suporte para os galhos, folhas e flores. Sem pressão suficiente de água, as células colapsam-se e as plantas murcham.

Funções das Células

Para permanecerem vivas, as células devem executar uma variedade de funções. Algumas células devem ser capazes de se movimentar e a maioria delas deve ter a capacidade de se dividir. Todas as células devem manter a concentração adequada de metabólitos, eletrólitos e água em seus citoplasmas, captar nutrientes e usá-los para a produção de energia, reciclar moléculas, descartar seus produtos do metabolismo e sintetizar proteínas. As células também devem ser capazes de responder à mudança no meio onde estão.

Movimentação

Muitos organismos unicelulares nadam, deslizam, balançam ou rastejam para procurar nutrientes ou escapar de seus inimigos. Organismos nadantes frequentemente se movem por um flagelo, uma longa estrutura de proteína em forma de cauda. Muitas bactérias, por exemplo, têm um, dois ou vários flagelos que giram como hélices para a movimentação longitudinal do organismo. Alguns organismos eucariotos, de célula única, como a euglena também possuem um flagelo, mas é mais grosso e mais longo do que os flagelos dos procariotos. Os flagelos dos eucariotos movimentam-se para cima e para baixo como um chicote. O espermatozoide

de mamíferos usa seu flagelo para nadar em direção ao óvulo da fêmea para a fecundação.

Os movimentos celulares nos eucariotos são também realizados por cílios pequenos, como fios de cabelo, formados de proteína e sintetizados pelos centríolos, estruturas em forma de barril situadas no citoplasma, que agrupam e quebram filamentos de proteína. Milhares de cílios estendem-se ao longo da membrana plasmática e cobrem a superfície da célula, dando-lhe uma aparência densa e peluda. Através da pulsação de seus cílios, como se fossem remos, organismos como o *Paramecium* movimentam-se em ambiente aquoso. Em células que não se movimentam, os cílios são usados para outros propósitos. No trato respiratório dos humanos, por exemplo, milhões de células ciliadas previnem que poeira e microorganismos aspirados entrem nos pulmões, varrendo-os para a corrente de muco na boca, onde serão engolidos. Flagelos e cílios eucariotos são formados a partir de corpos basais, estruturas proteicas pequenas, localizadas na parte externa da membrana plasmática. Corpos basais também auxiliam na ancoragem do flagelo e cílios.

Outras células como a ameba e as células brancas do sangue movem-se por movimento ameboide ou rastejam-se. Elas empurram seu citoplasma para formar um pseudópodo temporário, ou “pés falsos”, os quais localizam-se em frente à célula, como braços alongados. Eles, então, empurram a extremidade de seu citoplasma para os pseudópodos. Uma célula com movimentação ameboide poderá perder uma corrida para uma euglena ou *Paramecium*. Porém, embora isso seja lento, a locomoção ameboide é forte o suficiente para movimentar-se contra uma corrente, capacitando organismos que vivem em meios aquosos a perseguir e devorar suas presas, por exemplo, ou células brancas do sangue vagando pela corrente sanguínea a espreitar e englobar uma bactéria.

Nutrição

Todas as células requerem nutrientes para produção de energia e apresentam vários mecanismos diferentes para captá-los. Nutrientes dissolvidos em um lago, por exemplo, podem ser transportados através da membrana plasmática para o interior de um organismo que vive nesse ambiente, por meio de uma série de moléculas transportadoras especializadas. Em seres humanos, a cavidade do intestino delgado apresenta os nutrientes digeridos provenientes dos alimentos. As células que formam as paredes do intestino usam transportadores para captar os aminoácidos e outros nutrientes da cavidade intestinal para a corrente sanguínea. Certos

organismos unicelulares, como as amebas, também são capazes de localizar e captar os nutrientes. Esses organismos unicelulares usam um processo conhecido como endocitose, no qual a membrana plasmática engloba a partícula de nutriente, encapsulando-a em uma vesícula, que é subsequentemente incorporada pela célula.

Energia

As células requerem energia para exercer suas funções, incluindo movimentação, síntese e degradação de moléculas e transporte de substâncias pela membrana plasmática. Os nutrientes contêm energia, mas as células devem convertê-la dos nutrientes em outra forma de energia, especificamente, em moléculas de adenosina trifosfato (ATP), moeda de energia da célula. Em organismos eucariotos tais como plantas, animais e fungos, as mitocôndrias são responsáveis pela produção de ATP. O interior de cada mitocôndria é constituído por uma membrana interna que é dobrada em forma de labirinto com compartimentos separados, chamados crista. Nas cristas, há uma sequência de enzimas que convertem um metabólito em outro gerando ATP. Milhares de moléculas de ATP são produzidas a cada segundo pelas células. Na maioria das células eucarióticas, esse processo exige a presença de oxigênio, sendo conhecido como respiração aeróbia.

Alguns organismos procariotos apresentam metabolismo aeróbio, mesmo não possuindo mitocôndrias. Eles o fazem utilizando enzimas isoladas e dispersas no citoplasma. Muitas espécies de procariotos vivem em ambiente onde há pouco ou nenhum oxigênio, lugares como lama, lagos estagnados, ou no interior do intestino de animais. Alguns desses seres produzem ATP na ausência de oxigênio em um processo conhecido como metabolismo anaeróbio, onde o sulfato ou outra substância está no lugar do oxigênio. Ainda, outros seres procariotos e leveduras sintetizam ATP na ausência de oxigênio em um processo conhecido por fermentação.

Quase todos os organismos dependem do açúcar glicose para produzir ATP. A glicose é fabricada pelo processo de fotossíntese, no qual a energia luminosa é transformada em energia química, o açúcar. Os animais e fungos não podem realizar fotossíntese e dependem das plantas e de outros organismos fotossintéticos para essa função. Em plantas, como já visto, a fotossíntese acontece em uma organela chamada de cloroplasto. Os cloroplastos contêm numerosos compartimentos internos chamados tilacoides, onde enzimas auxiliam no processo de conversão de energia. Uma única célula de uma folha de árvore contém de 40 a 50 cloroplastos. Com luz solar suficiente,

uma árvore é capaz de produzir acima de duas toneladas de açúcar em um único dia. A fotossíntese em organismos procariotos, como em bactérias aquáticas, é realizada por enzimas agrupadas nas dobras da membrana plasmática, chamadas de cromatóforos. Bactérias aquáticas produzem o alimento consumido por organismos minúsculos que vivem em açudes, rios, lagos e mares.

Síntese de Proteínas

Uma célula contém cerca de 30.000 proteínas. Muitas dessas proteínas são enzimas necessárias para sintetizar a maioria das moléculas, que faz parte das células (carboidratos, lipídios, proteínas, ácido nucleico), ou para auxiliar na quebra de tais moléculas após terem sido danificadas. Outras proteínas fazem parte da estrutura da célula, estando presentes na membrana plasmática e ribossomos, por exemplo. Em animais, as proteínas também constituem hormônios e anticorpos, ou moléculas transportadoras. A hemoglobina, por exemplo, é uma proteína que transporta oxigênio nas células vermelhas do sangue.

Entretanto, antes que uma proteína possa ser sintetizada, a mensagem molecular para que isto ocorra está em um ou mais genes. Nos seres humanos, por exemplo, um gene contém apenas a informação para a proteína insulina, o hormônio que as células precisam para captar glicose da corrente sanguínea. Por outro lado, há pelo menos dois genes que contêm a informação para a formação do colágeno, proteína abundante na pele, tendões e ligamentos. O processo de síntese de proteína começa quando fatores de transcrição, em resposta a um sinal celular, ligam-se ao gene que contém o código para a proteína requerida ou para parte dela. As enzimas transferem o código para uma nova molécula chamada RNA mensageiro, a qual, por sua vez, leva o código do núcleo para o citoplasma. Isto possibilita que o código genético original permaneça no núcleo, com o RNA mensageiro entregando pequenos pedaços de informações do DNA para o citoplasma, conforme necessário. Dependendo do tipo de célula, centenas ou ainda milhares de moléculas de RNA mensageiro são produzidas por minuto.

Uma vez no citoplasma, a molécula de RNA mensageiro liga-se a um ribossomo. O ribossomo move-se em um trilho, estimulando outra forma de RNA, o RNA transportador. Este atua incorporando os aminoácidos necessários, presentes no citoplasma, na molécula de proteína que está sendo sintetizada. A proteína é modificada no retículo endoplasmático e no complexo

de Golgi para atingir a forma molecular definitiva que garante a esta exercer sua função em plenitude.

Divisão Celular

A maioria das células divide-se em algum momento durante seu ciclo de vida, e algumas, dezenas de vezes antes de morrerem. Os organismos dependem da divisão celular para reprodução, crescimento, reparo e substituição de células danificadas. Existem três tipos de divisão celular: fissão binária, meiose e mitose. Fissão binária ocorre nos procariotos e produz duas células idênticas. O processo mais complexo de mitose, o qual também produz duas células geneticamente idênticas a partir de uma única célula, é usado por muitos seres eucariotos unicelulares para a reprodução. Organismos multicelulares usam a mitose para o crescimento, reparo e substituição de células. No corpo humano, por exemplo, estimam-se 25 milhões de divisões mitóticas ocorrendo por segundo para substituir as células que já completaram seus ciclos de vida. Células do fígado, intestino e pele podem ser substituídas a cada dois ou três dias.

O tipo de divisão celular requerido para a reprodução sexuada é a meiose. Os organismos sexualmente reprodutores incluem algas, fungos, plantas, animais e seres humanos. A meiose difere da mitose, pois a divisão celular começa com uma célula que apresenta um núcleo com todos os cromossomos e termina com uma célula gamética, tal como o espermatozoide e o óvulo, que apresentam somente metade dos cromossomos. Quando o espermatozoide e o óvulo se unem durante a fertilização, a célula resultante desta união, chamada zigoto, contém o número total de cromossomos.

Origem das Células

O trabalho conjunto de especialistas, como físicos, geólogos, químicos e biólogos da evolução, tem sido requerida para compreender a evolução das células a partir da matéria sem vida do início da Terra. O planeta foi formado há aproximadamente 4,5 bilhões de anos. Por milhões de anos, violentas erupções vulcânicas lançaram substâncias tais como dióxido de carbono, nitrogênio, água e outras pequenas moléculas no ar. Essas pequenas moléculas, bombardeadas por irradiação ultravioleta e raios de tempestades intensas, colidiram-se para formar as ligações químicas estáveis das moléculas maiores, tais como os aminoácidos e os nucleotídeos; os blocos construtores das proteínas e ácido nucleicos, respectivamente. Experimentos indicam que essas grandes moléculas for-

maram-se espontaneamente sob condições de laboratório que simulam o provável ambiente do início da Terra.

Cientistas especulam que a chuva possa ter levado essas moléculas para dentro dos lagos para criar uma “sopa” primordial, formando a base para a união das proteínas, dos ácidos nucleicos (RNA) e lipídios. Alguns cientistas postulam que essas moléculas mais complexas foram formadas por ventos hidrotérmicos, em vez dos lagos. Independentemente da origem ou ambiente, cientistas concordam que proteínas, ácidos nucleicos e lipídios constituíram a matéria-prima das primeiras células. No laboratório, cientistas observam moléculas de lipídios juntando-se para formar esferas que se assemelham à membrana plasmática das células. Como resultado dessas observações, cientistas postulam que milhões de anos de colisões moleculares resultaram em uma esfera lipídica que incluía o RNA, a molécula mais simples capaz de autorreplicação. Essas agregações primitivas teriam sido as ancestrais das primeiras células procarióticas.

Estudos de fósseis indicam que cianobactérias, capazes de fazer fotossíntese, estavam entre as primeiras bactérias a se desenvolver, em uma estimativa de 3,4 a 3,5 bilhões de anos atrás. No ambiente do início da Terra, não havia oxigênio, e as cianobactérias provavelmente usaram a fermentação para produzir ATP. Durante centenas de milhões de anos, as cianobactérias realizaram fotossíntese, que produz oxigênio como produto secundário. O resultado foi o acúmulo gradual de oxigênio na atmosfera. A presença de oxigênio determinou o estágio seguinte da evolução com o surgimento da bactéria que o utilizava no metabolismo aeróbio, mais eficiente para a produção de ATP do que a fermentação. Alguns estudos moleculares da evolução dos genes em arqueobactéria sugerem que esses processos podem ter se desenvolvido em águas quentes ou ventos hidrotérmicos, ainda um pouco mais recente do que as cianobactérias, por volta de 3,5 bilhões de anos atrás.

As células eucarióticas podem ter evoluído de um procarioto primitivo há cerca de 2 bilhões de anos. Uma hipótese sugere que algumas células procarióticas perderam suas paredes celulares, permitindo que a membrana plasmática da célula se expandisse e se dobrasse. Essas dobras podem ter crescido para formar o núcleo e outras organelas encontradas nas células eucarióticas.

A Descoberta e o Estudo das Células

As primeiras observações das células foram feitas em 1665 por um cientista inglês, Robert Hooke, que

usou um microscópio primitivo de sua própria invenção para examinar uma variedade de objetos, incluindo um fino pedaço de cortiça. Anotando as fileiras das caixas minúsculas que ficavam acima do tecido de madeira, Hooke criou o termo célula, porque as caixas lembravam as pequenas células ocupadas pelos monges nos mosteiros. Embora Hooke tenha sido o primeiro a observar e descrever as células, ele mesmo não compreendia sua significância. Mais ou menos no mesmo período, o holandês fabricante de microscópios Antoni van Leeuwenhoek foi o pioneiro na invenção de um dos melhores microscópios da época. Usando sua invenção, Leeuwenhoek foi o primeiro a observar, desenhar e descrever uma variedade de organismos vivos, incluindo bactérias presentes na saliva, organismos unicelulares dos açudes e espermatozoides nadando no sêmen. Contudo, dois séculos se passaram antes de os cientistas compreenderem a verdadeira importância das células.

Ideias modernas sobre as células apareceram em 1800, quando microscópios de luz melhorados possibilitaram aos cientistas observar mais detalhes das células. Trabalhando juntos, o botânico alemão Matthias Jakob Schleiden e o zootecnista, também alemão, Theodor Schwann reconheceram as semelhanças fundamentais entre as células das plantas e animais. Em 1839, eles propuseram a revolucionária ideia de que todas as coisas vivas eram constituídas de células. Sua teoria deu origem à biologia moderna: uma nova maneira de ver e investigar o mundo natural.

No final do século de XIX, como os microscópios de luz tinham evoluído ainda mais, os cientistas foram capazes de observar cromossomos no interior da célula. O trabalho de pesquisa então apoiado por novas técnicas para marcar partes da célula, possibilitou a primeira observação detalhada da divisão celular, incluindo as observações das diferenças entre meiose e mitose, em 1880. Nas primeiras décadas do século XX, muitos cientistas estudaram o comportamento dos cromossomos durante a divisão celular. Naquela época, acreditava-se que as mitocôndrias transmitiam as informações hereditárias. Em 1920, no entanto, cientistas determinaram que os cromossomos carregavam os genes e que esses transmitiam as informações hereditárias de geração para geração.

Durante esse mesmo período, os cientistas começaram a entender alguns dos processos químicos nas células. Na década de 1920, a ultracentrífuga foi desenvolvida. A ultracentrífuga é um instrumento que

centrifuga as células íntegras ou rompidas em tubos de ensaio em uma velocidade muito alta. Com isso, partes mais pesadas da célula movem-se para o fundo do tubo de ensaio. Esse equipamento capacita os cientistas a separar as mitocôndrias do resto da célula e a estudar suas reações químicas. No final da década de 1940, os cientistas foram capazes de explicar a função das mitocôndrias nas células.

Enquanto alguns cientistas estudavam as funções das células, outros examinavam detalhes de suas estruturas. Eles foram ajudados por um desenvolvimento tecnológico crucial na década de 1940: a invenção do microscópio eletrônico, o qual usa alta energia de elétrons em vez de ondas luminosas para ver os espécimes. Novas gerações de microscópios eletrônicos apresentam resolução 1.000 vezes maior do que os microscópios de luz. Essa poderosa resolução revelou organelas tais como retículo endoplasmático, lisossomos, complexo de Golgi e citoesqueleto. Os campos científicos da estrutura e funcionamento das células continuam a complementar um ao outro, conforme cientistas exploram a enorme complexidade das células.

A descoberta da estrutura do DNA em 1953 pelo bioquímico americano James D. Watson e o biofísico britânico Francis Crick introduziu a era da biologia molecular. Hoje, investigações no mundo das células, dos

genes e proteínas constituem uma das áreas mais importantes de desenvolvimento de todas as ciências. Um campo ativo, particularmente recente, tem sido a investigação dos sinais celulares, processo no qual mensagens moleculares são direcionadas no interior das células por vias proteicas complexas.

Uma área de pesquisa recente e importante em biologia celular é a morte programada das células ou apoptose. Milhões de vezes por segundo, no corpo humano, células cometem suicídio como uma parte essencial do ciclo normal da substituição celular. Isso também parece ser uma inspeção (*check-up*) contra as doenças; quando as mutações ocorrem, a célula irá, geralmente, se autodestruir. Se isso não ocorrer, a célula pode dividir-se e dar origem às células-filha mutadas, as quais continuarão a se multiplicar e se espalhar, formando um tecido chamado neoplasia (tumor). Esse crescimento desregulado de células modificadas pode ser benigno, neutro ou cancerígeno e ameaçar tecidos saudáveis. O estudo da apoptose é um caminho que cientistas exploram no esforço para entender como as células se tornam cancerígenas.

Referência

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. Molecular Biology of the Cell. 4th ed. Hardback Book, 2002, p. 1616

2. Estrutura e Propriedades dos Ácidos Nucleicos

Rozangela Verlengia
Rosario Dominguez Crespo Hirata
Ana Cristina Silva Rebelo
Mário Hiroyuki Hirata

Introdução

As informações genéticas dos seres vivos são armazenadas nos ácidos nucleicos. Existem dois tipos de ácidos nucleicos: o desoxirribonucleico (DNA) e o ribonucleico (RNA). Nos eucariotos, o DNA é encontrado no núcleo da célula, enquanto o RNA está presente no citoplasma, havendo pouco no núcleo. Por sua vez, nos procariotos, seres vivos destituídos de núcleo, tanto o DNA quanto o RNA, estão presentes no citoplasma.

Os ácidos nucleicos representam polímeros de nucleotídeos, sendo desoxirribonucleotídeos para o DNA e ribonucleotídeos para o RNA (Figs. 2.1A e B; respectivamente). Cada nucleotídeo é constituído de uma molécula de açúcar, pentose, que no DNA é a 2' desoxirribose, e no RNA, a ribose, uma molécula de trifosfato, e as bases nitrogenadas, purinas e pirimidinas. As bases nitrogenadas ligam-se ao carbono 1' da pentose por meio de ligações glicosídicas, enquanto a molécula de trifosfato liga-se ao carbono 5' da molécula de açúcar por meio de ligações fosfato-diéster (Figs. 2.1A e B).

Os nucleotídeos ligam-se uns aos outros por ligações fosfato-diéster que ocorrem entre o grupo fosfato alfa (α) ligado ao carbono 5' da ribose ou 2' desoxirribose ao grupo hidroxila (OH) do carbono 3' do açúcar do nucleotídeo adjacente (Fig. 2.2). Assim, a formação do polímero de ácido nucleico ocorre na direção 5' à 3'. Os fosfatos do nucleotídeo localizados na posição gama e beta são clivados pela pirofosfatase e liberados na forma de duas moléculas de fosfato inorgânico, gerando a

Os nucleotídeos ligam-se uns aos outros por ligações fosfato-diéster que ocorrem entre o grupo fosfato alfa (α) ligado ao carbono 5' da ribose ou 2' desoxirribose ao grupo hidroxila (OH) do carbono 3' do açúcar do nucleotídeo adjacente (Fig. 2.2). Assim, a formação do polímero de ácido nucleico ocorre na direção 5' à 3'. Os fosfatos do nucleotídeo localizados na posição gama e beta são clivados pela pirofosfatase e liberados na forma de duas moléculas de fosfato inorgânico, gerando a

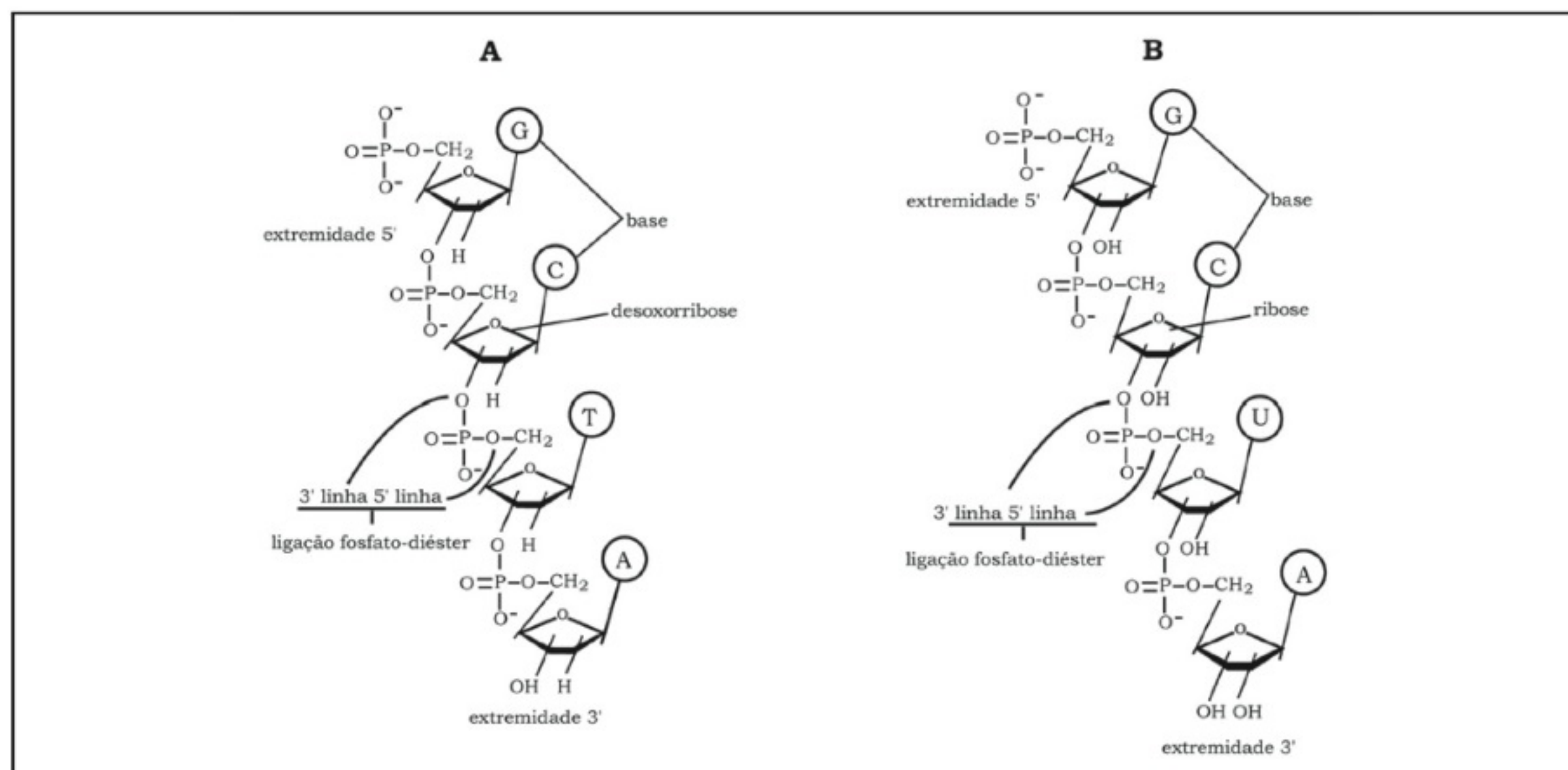


Figura 2.1 – Estrutura química dos ácidos nucleicos. (A) Ácido desoxirribonucleico (DNA) constituído de desoxinucleotídeos que contém desoxirribose, grupamento fosfato e bases nitrogenadas (A, C, G, T). (B) Ácido ribonucleico (RNA) constituído de nucleotídeos que contém ribose, grupamento fosfato e bases nitrogenadas (A, C, G, U). A ribose contém uma hidroxila (OH) a mais no carbono 2' da pentose. Modificado de: www.phschool.com, acesso 29/06/2009.

energia necessária para o crescimento da cadeia nucleotídica (Fig. 2.2). Os fosfatos liberados posteriormente são utilizados em novas reações de síntese pela célula.

Os ácidos nucleicos têm, normalmente, cinco diferentes tipos de bases nitrogenadas: citosina (C), timina (T), uracila (U), adenina (A) e guanina (G). Essas bases são estruturalmente agrupadas em pirimidinas (citosina, timina e uracila) e purinas (adenina e guanina). As pirimidinas são constituídas estruturalmente de um anel aromático, enquanto as purinas apresentam dois anéis

aromáticos (Fig. 2.3). O DNA contém A, C, G e T, enquanto o RNA contém A, C, G e U, em vez de T.

Ácido Desoxirribonucleico

O DNA é composto de duas cadeias polinucleotídicas pareadas, na forma de dupla hélice, dispostas em direções contrárias, sendo denominadas antiparalelas, ou seja, suas direções 5' → 3' são opostas (Fig. 2.4). As moléculas de açúcar-fosfato localizam-se na parte

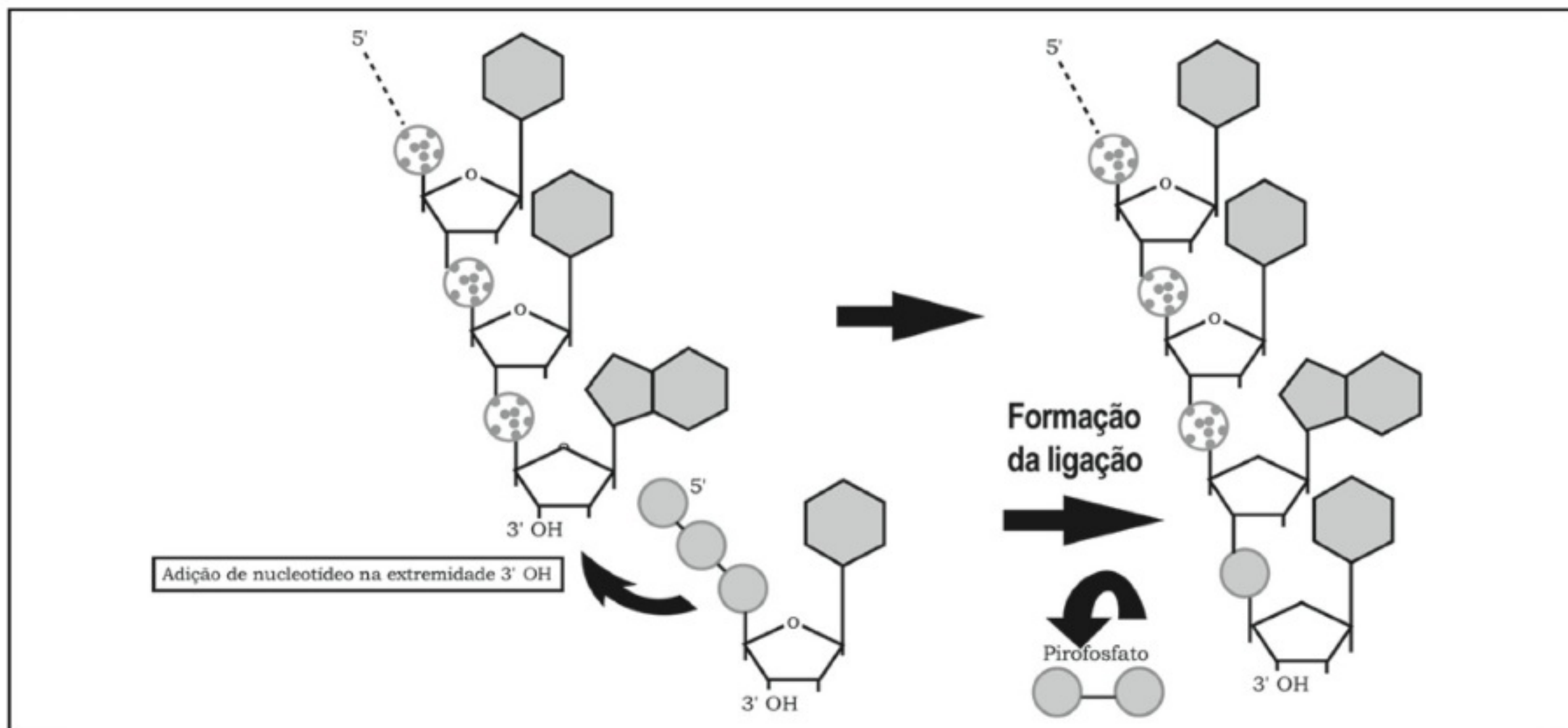


Figura 2.2 – Formação do polímero de ácido nucleico. Os nucleotídeos ligam-se uns aos outros por meio de ligações fosfato-diéster que ocorrem entre o fosfato alfa ligado ao carbono 5', da molécula de açúcar do nucleotídeo e a hidroxila do carbono 3' da molécula de açúcar do nucleotídeo adjacente, com liberação de duas moléculas de fosfato inorgânico. Modificado de Lewin, 1994.

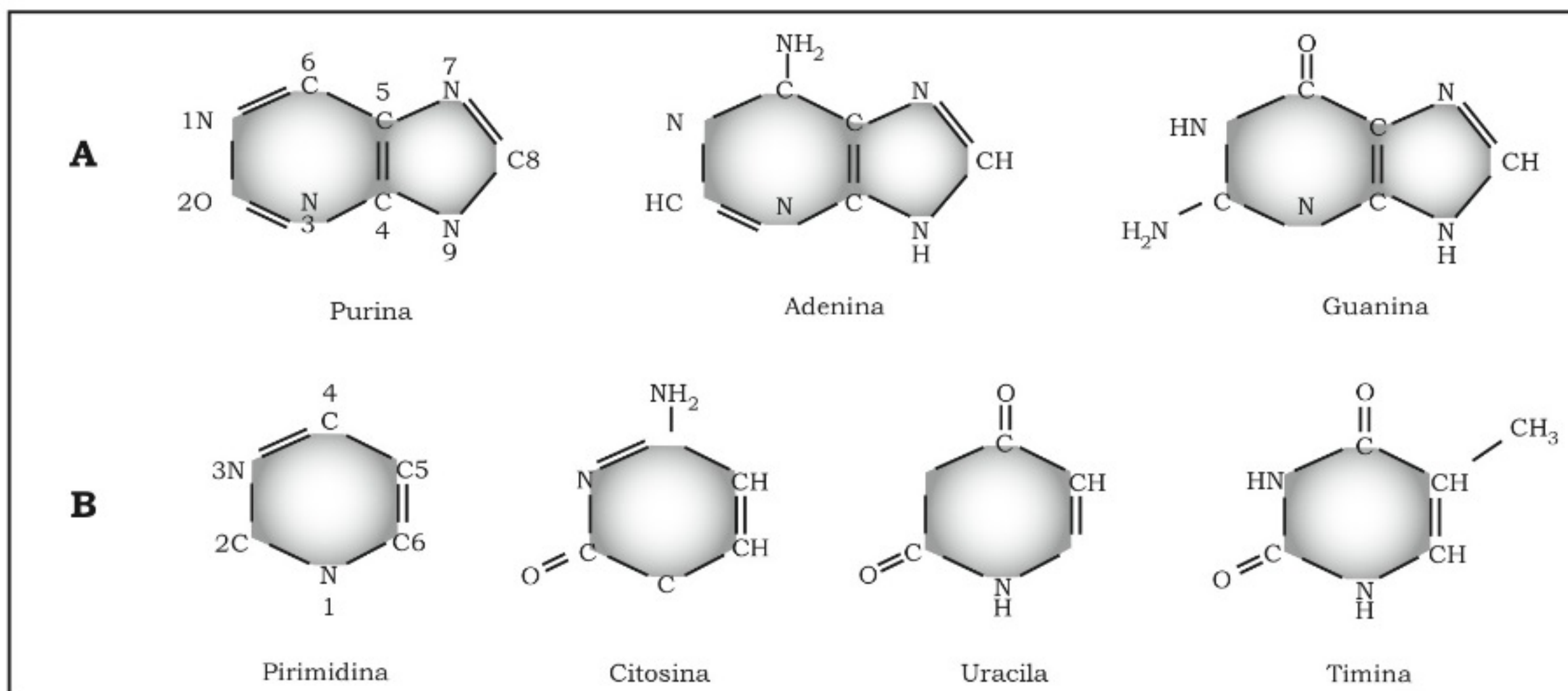


Figura 2.3 – Bases nitrogenadas. (A) Purinas formadas por dois anéis aromáticos (adenina e guanina). (B) Pirimidinas constituídas por um anel aromático (citosina, timina e uracila). Modificado de Lewin, 1994.

externa da estrutura e as bases nitrogenadas estão projetadas na parte interna.

As fitas polinucleotídicas são mantidas juntas por meio de interações químicas entre as bases nitrogenadas das duplas fitas: 1. pontes de hidrogênio que são ligações eletrostáticas fracas formadas entre o átomo de oxigênio, parcialmente carregado com carga negativa de uma base, e o átomo de hidrogênio, parcialmente carregado com carga positiva da base complementar; 2. interações hidrofóbicas; e 3. forças de van der Waals entre os pares de bases adjacentes empilhadas.

Uma das características marcantes da estrutura da dupla-fita do DNA consiste no pareamento específico das bases nitrogenadas (A•T e C•G), estabelecido por Chargaff em 1951. Assim, a relação entre as purinas e pirimidinas é constante em todos os organismos, ou seja, a quantidade da purina **adenina** é igual à da pirimidina **timina**; da mesma forma, a quantidade da purina **guanina** é igual à da pirimidina **citossina**. No RNA, a timina é substituída pela uracila que em determinadas situações pode parear com a adenina.

O pareamento é definido pelos tamanhos e estruturas químicas das bases nitrogenadas. A presença de grupos **ceto** (C=O) e **amino** (C-NH₂) permite a formação

de **pontes de hidrogênio** entre as bases complementares. Dessa forma, **timina** e **uracila**, que contêm grupo ceto, podem parear com **adenina**, que contém grupo amino, através de uma ponte de hidrogênio. **Citocina** e **guanina**, que contêm tanto grupo ceto quanto amino, podem formar duas pontes de hidrogênio. Além disso, uma ponte de hidrogênio adicional pode ser formada entre os nitrogênios dos anéis aromáticos em todos os pares. Assim, entre **A** e **T** ou **U** são formadas duas pontes de hidrogênio, e entre **C** e **G** três pontes (Fig. 2.5). A essa especificidade de ligação química entre as bases nitrogenadas, Watson e Crick denominaram complementariedade, frequentemente chamada de pares de Watson-Crick.

Com relação ao tamanho das bases, as pirimidinas são menores que as purinas. Entretanto, os pareamentos entre as bases A•T e C•G têm aproximadamente o mesmo tamanho e dimensões semelhantes. Dessa maneira, os dois pares ocupam o mesmo espaço, permitindo uma dimensão uniforme ao longo da molécula de DNA. Assim, não existe nenhuma restrição quanto à sequência de nucleotídeos ao longo do DNA.

Outras interações entre bases nitrogenadas podem ocorrer. Por exemplo, a guanina (purina) pode teoricamente formar pontes de hidrogênio com a timina (piri-

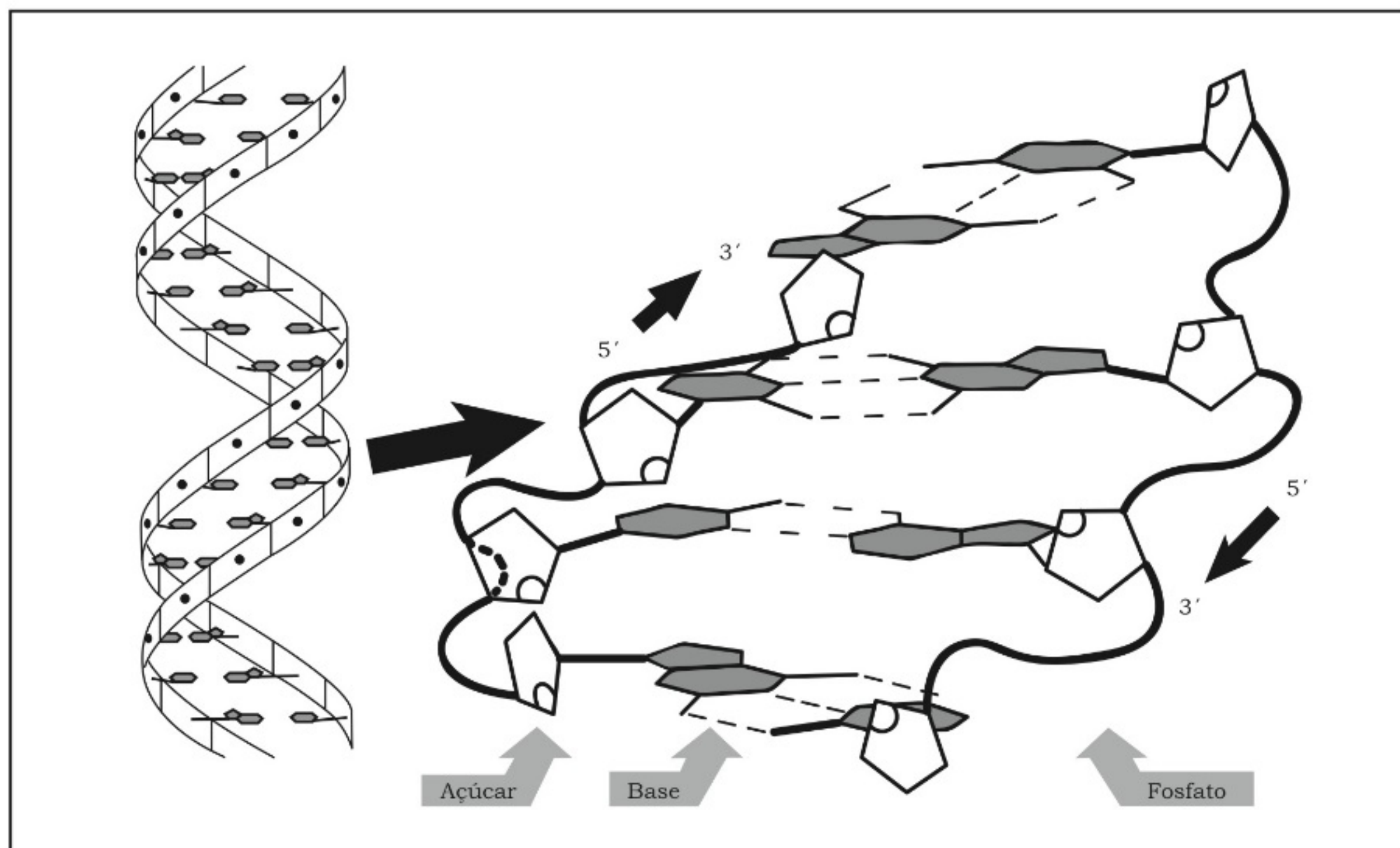


Figura 2.4 – Esquema da dupla hélice da molécula de DNA. Orientação da dupla hélice para a direita, com uma disposição antiparalela dos nucleotídeos; o grupamento fosfato e a molécula de açúcar encontram-se localizados na parte externa da dupla hélice de DNA e as bases nitrogenadas localizam-se na parte interna da molécula. Modificado de Lewin, 2004.

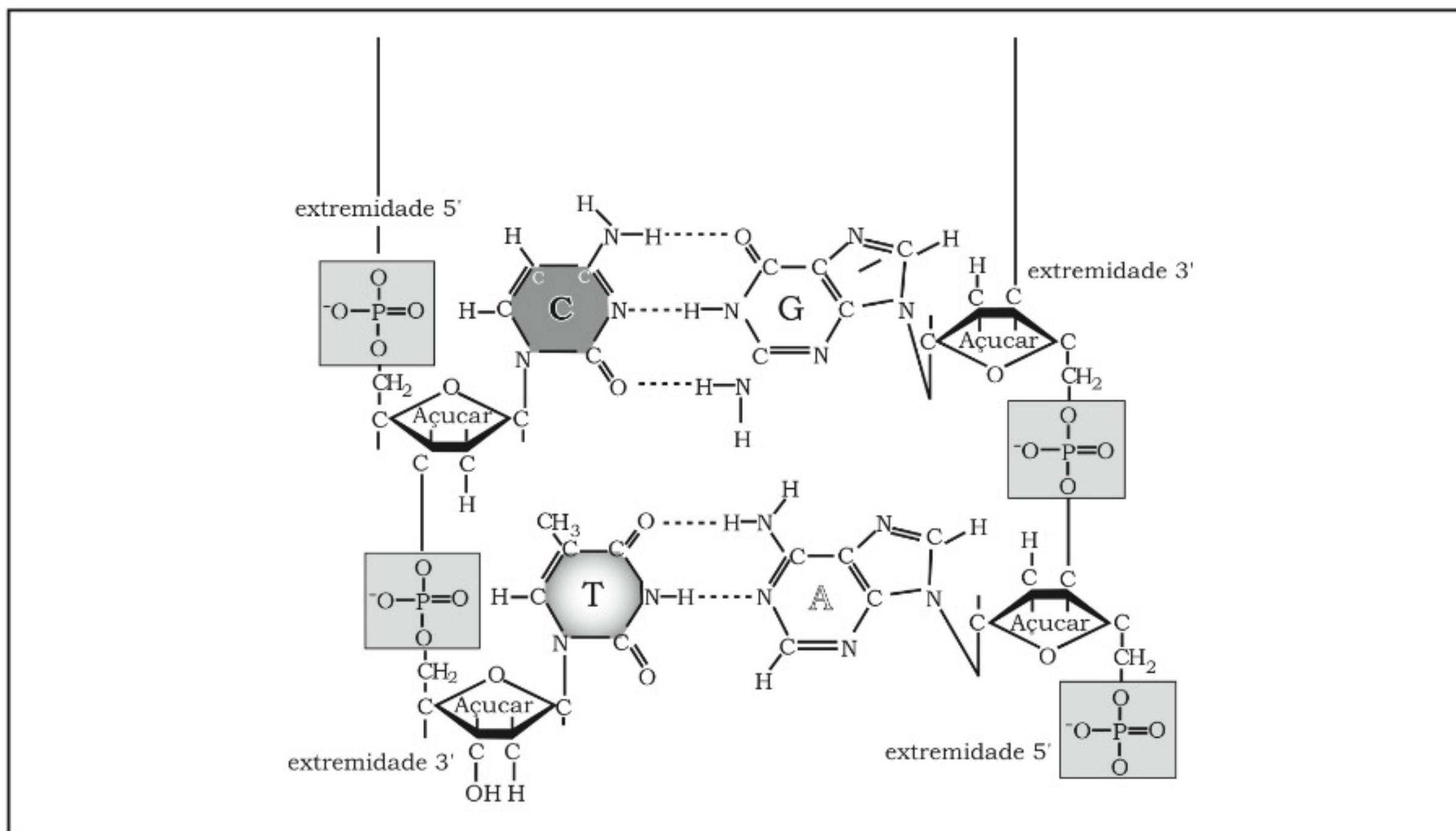


Figura 2.5 – Complementariedade das bases nitrogenadas. Pareamento específico entre citosina (C) e guanina (G), com a formação de três pontes de hidrogênio. Pareamento das bases nitrogenadas timina (T) e adenina (A) com a formação de duas pontes de hidrogênio. Modificado de Cooper, 2001.

midina) causando uma distorção de menor grau na dupla hélice. O espaço disponível na hélice também pode permitir o pareamento entre duas pirimidinas C•T, bem como G•T. Embora esses pareamentos não sejam comumente encontrados no DNA, o pareamento G•U é comum nas regiões de dupla hélice que ocorrem na molécula de RNA.

Na natureza também está presente a forma circular de DNA, em que a dupla fita forma uma estrutura fechada sem extremidades livres, como o DNA genômico de procariotos e de vários DNA virais. As moléculas de DNA circular também são encontradas nas mitocôndrias, que estão presentes em quase todas as células eucarióticas e nos cloroplastos, os quais são encontrados em plantas e em alguns eucariotos unicelulares. O DNA circular se desenrola durante a replicação do DNA, no qual há uma torção na porção restante da molécula, pois o final da fita não está livre para a rotação. Como resultado, a molécula de DNA gira em torno de si mesma, formando um superenrolado (*supercoils*). Em outras palavras, quando parte da hélice do DNA é cortada, o restante da molécula começa a se abrir.

Entretanto, bactérias e células eucarióticas contêm topoisomerase I, a qual pode aliviar qualquer torção ge-

rada em moléculas de DNA celular durante a replicação ou outros processos. Essa enzima liga-se ao DNA celular e cliva a ligação fosfodiéster na fita. A extremidade clivada leva à perda dos superenrolados. Finalmente, a mesma enzima liga as duas extremidades da fita livre.

Outro tipo de enzima é a topoisomerase II, que cliva em duas a fita dupla de DNA e depois as religa. Como resultado, a topoisomerase II pode sofrer torção e liga duas moléculas de DNA circular como se fosse uma ligação em cadeia.

Ácido Ribonucleico

A molécula de RNA é constituída por um polímero de nucleotídeos dispostos em uma fita simples. Devido aos pareamentos das bases nitrogenadas, as moléculas de RNA apresentam diferentes conformações e tamanhos que lhes permitem realizar funções específicas nas células. Podem ser formadas estruturas secundárias do tipo “grampos” (*hairpins*) que são formadas pelo pareamento de bases próximas ($\approx 5-10$ a nucleotídeos uma da outra) e do tipo “alças em hastes” (*stem-loops*) que se formam pelo pareamento de bases mais distantes (≈ 50 a várias centenas de nucleotídeos) (Fig. 2.6). Essas simples dobras podem cooperar para a formação de

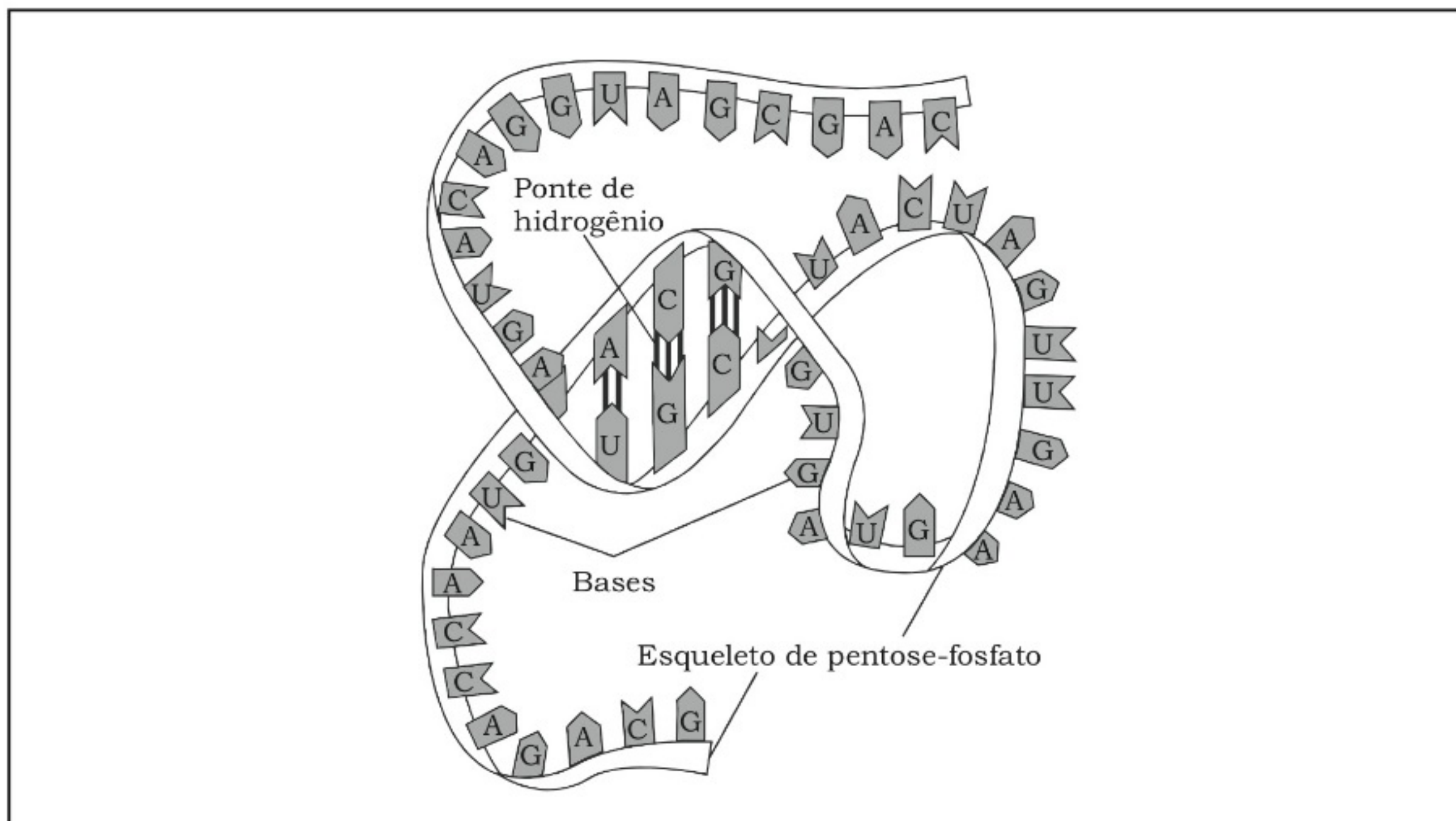


Figura 2.6 – Esquema ilustrativo da molécula de mRNA. Apresenta estruturas secundárias decorrentes de interações entre as bases nitrogenadas. Modificado de: www.uic.edu, acesso 29/06/2009.

estruturas terciárias mais complicadas, uma das quais é denominada “pseudonó”.

As moléculas de RNA estão presentes em todas as células (eucarióticas e procarióticas) e são de extrema importância para uma série de processos vitais. A atividade do RNA é determinada por sua estrutura, ou a forma de como as bases estão associadas entre si. Nesse contexto, temos: RNA mensageiro, RNA transportador, RNA ribossômico, pequenos RNA nucleares e RNAs que fazem parte das telomerasas. A estrutura e a função dos diferentes tipos de RNA são descritas a seguir com a síntese das funções no quadro 2.1.

RNA mensageiro (mRNA)

O RNA mensageiro (mRNA) é a molécula intermediária no processo de transferência de informação genética na célula para a síntese de proteínas. É constituído de uma fita simples de nucleotídeos de tamanho variável, dependendo do tamanho de cada gene, e corresponde de 1 a 5% do RNA total da célula.

Nos eucariotos, o mRNA apresenta, na extremidade 5', uma estrutura denominada caputo G (Cap G) formada pela ligação 5'→5' do nucleotídeo GTP com a extremidade 5' metilada do mRNA. O Cap G

está envolvido na ligação e orientação do posicionamento do mRNA ao RNA ribossômico (rRNA). Por outro lado, na extremidade 3', apresenta uma cauda de poli A, envolvida na proteção do mRNA do ataque de nucleases presentes no citoplasma da célula durante o processo de tradução.

A molécula de mRNA, nos eucariotos, é formada inicialmente como pré-RNA, denominada de transcrito primário ou RNA heteronuclear (hnRNA). O hnRNA contém regiões codificadoras, os éxons, e regiões não codificadoras, os íntrons. Em sequência ao processo de transcrição, os íntrons são removidos pela ação de **pequenos RNAs nucleares** (snRNA), os quais possuem atividade catalítica.

RNA transportador (tRNA)

O RNA transportador (tRNA) está presente no citoplasma e representa 10 a 15% do RNA total da célula. Os tRNAs estão envolvidos no processo de síntese de proteínas, participando do sistema de reconhecimento do código genético (triplete de bases – códon genético) presente no mRNA. É constituído de uma fita simples de 70-90 nucleotídeos em comprimento que, devido ao pareamento das bases, adquire a forma de uma folha de trevo

Quadro 2.1 – Funções celulares atribuídas a moléculas de RNA. Fonte: Muotri, A.R. Evolução no tubo de ensaio: ribozimas artificiais In: *Biologia Molecular e Evolução*. Mitioli S.R., ed. Holos, Ribeirão Preto, 2001.

RNA	Função
RNA	Responsável pela tradução da informação em síntese proteica
mRNA	Decodificação do mRNA, transferase peptídica, translocação do peptidil-tRNA
tRNA	Carreador de aminoácidos durante a síntese proteica e outros passos anabólicos
U1, U2, U4/6 e U5 snRNA	Excisão pré-RNA
U3 snRNA	Processamento de rRNA
U7 snRNA	Clivagem da extremidade 3' do mRNA de histonas
U11 snRNA	Clivagem/poliadenilação da extremidade 3' de pré-RNAs
2,5S RNA	Catálise parcial da transferase do RNP glucano
MIRNA	Catálise parcial da RNase (processamento de tRNA)
Telomerase do RNA	Catálise parcial da RNase (processamento de tRNA)
7S RNA	Componente do sinal de reconhecimento (translocação proteica)
Primers de RNA	Responsável pela tradução da informação em síntese proteica
Telomerase do RNA	Início da duplicação do DNA
micF'	RNAs regulatórios em procariotos

(Fig. 2.7). No vértice inferior dessa estrutura, encontra-se uma sequência variável de três nucleotídeos que forma o anticódon e pode parear com a sequência correspondente na molécula de mRNA, denominada códon (Fig. 2.7A).

Na extremidade 3' da molécula do tRNA, está localizada a sequência AC 3'→5' na qual aminoácidos, específicos se ligam, denominada de haste acceptora (Fig. 2.7B). Dessa forma, um códon particular no mRNA é relacionado por meio de um tRNA a um dado aminoácido (Fig. 2.7C). Quando o tRNA está ligado ao aminoácido, este é denominado aminoacil tRNA. Contudo, quando está ligado ao aminoácido iniciador da síntese proteica (metionina), é denominado metionil-tRNA.

Considerando que a região acceptora é comum para todos os tRNAs, a especificidade do reconhecimento aminoácido-tRNA é promovida pela enzima aminoacil-tRNA sintetase, ou seja, cada uma reconhece um aminoácido e todos os seus tRNAs compatíveis ou cognatos. Essas enzimas acopladoras ligam um aminoácido a hidroxilas 2' ou 3' livres da adenina na extremidade acceptora do tRNA (3' da molécula de tRNA) por meio de uma reação de dois passos que requer ATP.

RNA ribossômico (rRNA)

O RNA ribossômico (rRNA) é responsável pelo auxílio na decodificação da informação genética a partir das sequências de nucleotídeos do mRNA em sequências de aminoácidos. Encontra-se no citoplasma das células (eucarióticas), associados às proteínas, constituindo uma partícula ribonucleoproteica. Representa aproximadamente 75% do RNA total da célula.

O rRNA é constituído de duas subunidades com tamanhos e funções diferentes. A subunidade maior catalisa a ligação peptídica entre aminoacil-tRNA e peptidil-tRNA durante o processo da formação da cadeia polipeptídica. Também hidrolisa o peptidil-tRNA durante a fase de terminação do processo de tradução.

Ambas as reações ocorrem no centro peptidiltransferase (PTase – também denominado sítio P) do ribossomo. Devido a esta função, o ribossomo é considerado uma ribozima, porém a atividade catalítica somente é ativa na presença de componentes proteicos. A subunidade menor liga o mRNA e é responsável pela fidelida-

de da tradução, assegurando o pareamento correto das bases entre o aminoacil-tRNA e os códons do mRNA no centro de decodificação (Fig. 2.8).

Os ribossomos são denominados pela unidade de velocidade de sedimentação (*Svedberg* –S), que em mamíferos é de 80S. Estas estruturas consistem de

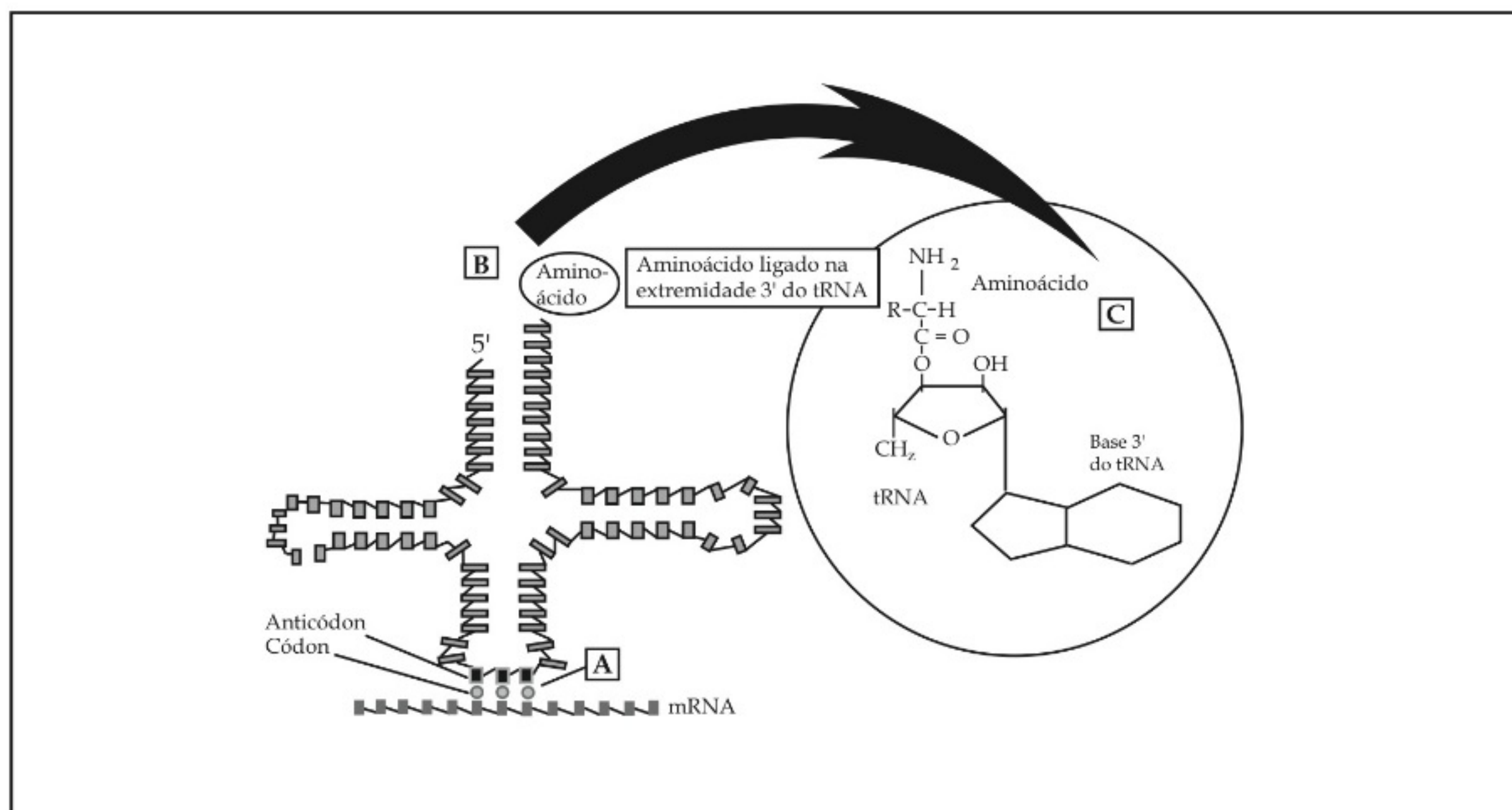


Figura 2.7 – Esquema ilustrativo da molécula de RNA transportador. Apresenta uma estrutura em forma de trevo formada pelo pareamento de bases dentro da molécula. (A) Trinucleotídeo de sequência variável denominado anticódon que pode parear com um códon da molécula de mRNA. (B), Haste aceptora constituída por uma sequência ACC 3'-->5' para a ligação de um aminoácido específico. (C), Molécula de aminoácido a ser adicionado à extremidade 3' da molécula de tRNA. Modificado de Lewin, 2004.

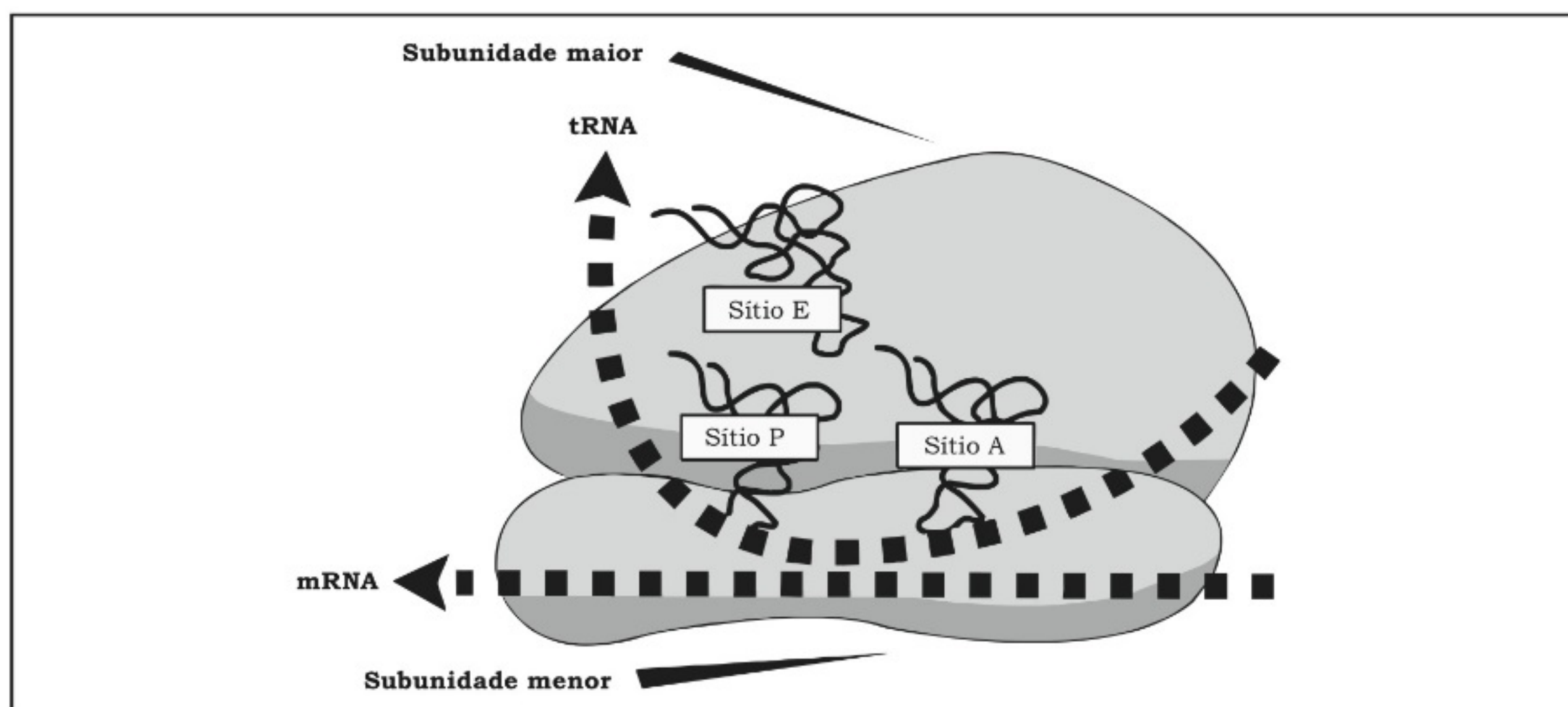


Figura 2.8 – Estrutura esquemática dos ribossomos. Mostra as subunidades maior e menor e os sítios de atividade: sítio A = ligação do aminoacil-tRNA; Sítio P = ligação do peptidil-tRNA; sítio E = saída do peptídeo. Modificado de Lewin, 2004.

uma subunidade menor (40S), constituída por rRNA 18S (1869 bases) e aproximadamente 33 diferentes proteínas ribossômicas e uma subunidade maior (60S) que contém rRNA 5S (120 bases), 5,8S (159 bases), e 28S (5.025 bases) e aproximadamente 49 diferentes proteínas. Análises comparativas de rRNAs e das proteínas ribossômicas sugerem fortemente que todos os ribossomos evoluíram a partir de partículas ribonucleoproteicas de um ancestral comum.

Participação do RNA na Síntese Proteica

A síntese proteica pode ser dividida em diferentes fases, as quais podem ser descritas como uma série de reações parciais promovidas por fatores proteicos solúveis. O início da tradução envolve, em eucariotos, no mínimo dez fatores de iniciação (eIFs) que correspondem a mais de 26 diferentes polipeptídeos (para revisão ver Pestova e Hellen, 2000). Em alguns organismos eucariotos, a síntese proteica inicia-se com as subunidades ribossômicas separadas, as quais são mantidas nessa posição pela ação dos fatores de iniciação eIF3 ou eIF6 que previnem sua associação.

O primeiro passo envolvido no processo de tradução é o reconhecimento do tRNA iniciador (metionil-tRNA) pelo eIF2, formando um complexo ternário juntamente com trifosfato de guanosina (GTP) antes da ligação com a subunidade 40S (Fig. 2.9A). Na subunidade 40S, o metionil-tRNA liga-se exclusivamente ao sítio P. Essa especificidade dá-se pelo fato de o tRNA iniciador ter sequência e conformação estrutural únicas que permitem que se ligue ao sítio P e não ao A. Em seguida, os fatores eIF1A, eIF3 e eIF4C ligam-se à subunidade 40S, estabilizando o complexo ternário ao sítio A (Fig. 2.9B).

A ligação do mRNA ao complexo rRNA 40S envolve um efeito sinérgico da região CAP 5' terminal e da cauda de poli(A) 3' terminal e a interação de uma rede de fatores de iniciação, incluindo eIF4E, eIF4A e eIF4G, e as subunidades dos eIF4F, eIF4B e proteína de ligação à cauda de poli(A) (PABP) (Figs. 2.9C e D).

Os ribossomos localizam o códon iniciador do mRNA com CAP por varredura (*scanning*) dos 50-100 nucleotídeos a montante do sítio de ligação inicial (códon AUG), a partir da extremidade 5' do mRNA. Esse processo parece ser modulado pela ligação do complexo eIF4F/PABP ao CAP e à cauda de poli A, porém foi descrito que os mRNAs sem essas estruturas são traduzidos independentemente do processo de varredura. Segundo Jackson (2005), nos eucariotos não existe uma sequência

consenso antes do códon iniciador e o processo ocorre por meio de um mecanismo de varredura.

O estágio final no processo de iniciação da tradução é a junção das subunidades 60S ao complexo 40S, formado no códon iniciador do mRNA (Fig. 2.9E). Essa junção causa a liberação de alguns ou de todos os fatores de iniciação a partir da subunidade 40S e a formação do rRNA 80S, que se torna competente para iniciar a tradução. Após a ligação do peptidil-tRNA ao sítio P e formação da ligação peptídica, a cadeia de polipeptídeo nascente é translocada do sítio A para o sítio P do ribossomo. Essa reação é catalisada, nos eucariotos, pelo fator 2 de elongação (eIF-2). Durante a translocação do peptidil-tRNA do sítio A para o P, o tRNA desacilado (*deacylated*) é cotranslocado do sítio P para o sítio E (E para saída, do inglês *exit*), sendo posteriormente desligado (Fig. 2.9).

Ribossomos de mamíferos têm 80 proteínas ribossômicas, 49 das quais estão envolvidas na estrutura e função dos ribossomos, sendo que 32 destas apresentam homologia com proteínas de rRNA de eubactéria. Outras proteínas ribossômicas de eucariotos participam de outras funções, tais como tráfego intracelular e translocação de proteínas ribossômicas para o núcleo, processamento rRNA e estruturação do ribossomo. Alternativamente, essas proteínas podem estar envolvidas na regulação da síntese proteica, particularmente em eucariotos, que têm processos de controle mais complexos que os de eubactérias (Dresios et al., 2006).

As proteínas ribossômicas apresentam diversas funções nos ribossomos, tais como atividade de decodificação e de PTase. Algumas atuam como chaperonas e facilitam o dobramento das subunidades de rRNA durante a biogênese e estabilizam a conformação ótima da estrutura definitiva. Os ribossomos também possuem atividade helicase mRNA, que rompe as estruturas terciárias a jusante (*downstream*) do mRNA durante a fase de elongação da tradução (Dresios et al., 2006).

Pequenos RNA Nucleares (snRNA)

Os pequenos RNA nucleares (snRNA) representam um grupo de RNAs com atividade catalítica. Foram descobertos no início da década de 1980 por Cech et al. que demonstraram que alguns íntrons são capazes de catalisar sua própria remoção do pré-mRNA sem a participação de proteínas (Fig. 2.10). Esses íntrons foram denominados de autocatalíticos (*self-splicing*, em inglês) e designados por seus descobridores de ribozimas, termo esse empregado para os RNAs que apresentam propriedades catalíticas.

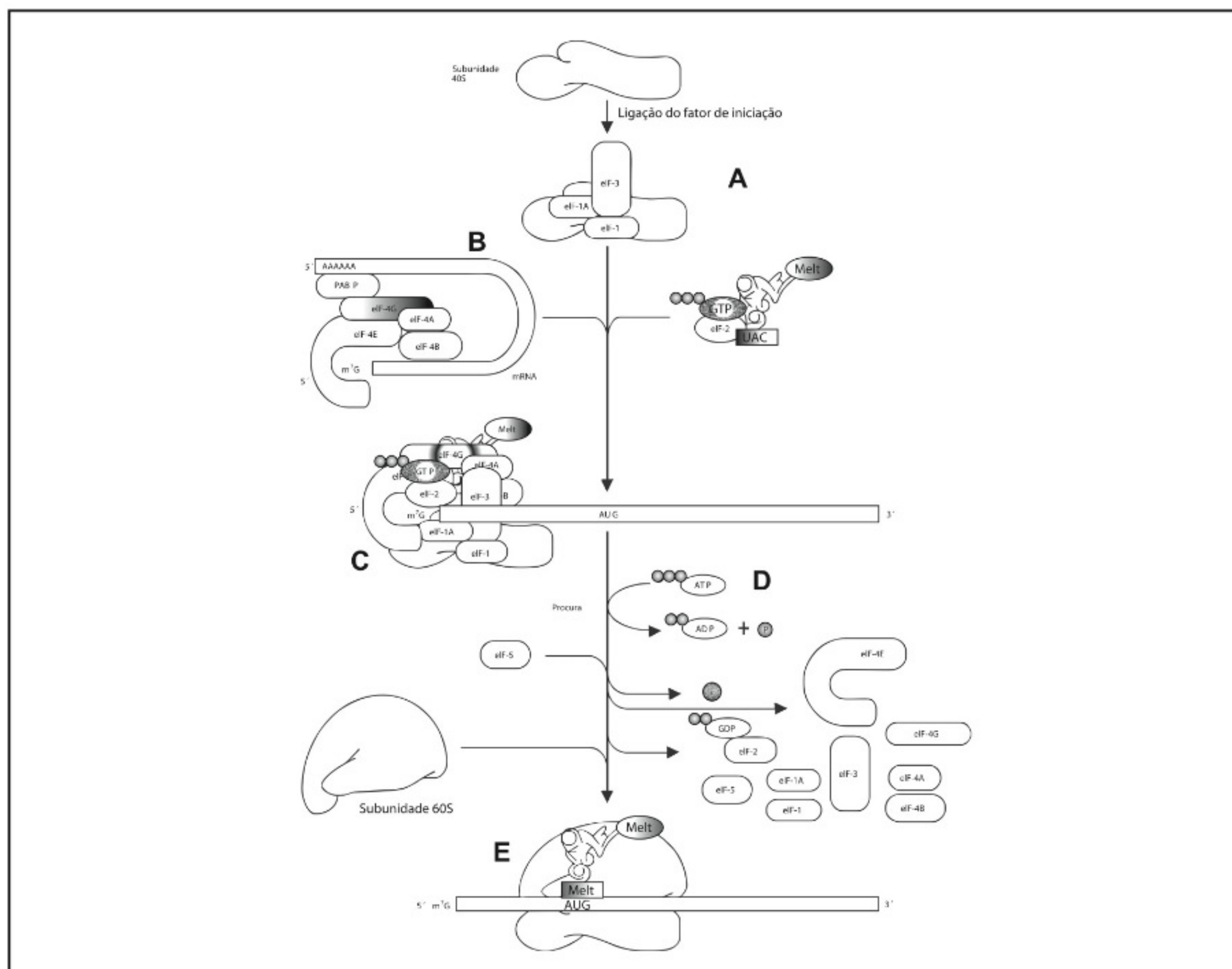


Figura 2.9 – Processo de síntese proteica. **(A)** Os fatores de transcrição inicial, eIF1-3, eIF-1 e eIF-1A; ligam-se à subunidade ribossomal 40S. Em sequência, o mRNA e o metionil-tRNA são acoplados à subunidade menor. **(B)** Posteriormente, pela ação dos fatores eIF-1 e eIF-2 e **(C)** a energia liberada pela GTP (GDP + Pi). **(D)** A subunidade maior (60S) **(E)** é acoplada à subunidade menor (40S), resultando no complexo ribossômico funcional. Modificado de Cooper, 2001.

As ribozimas são RNA catalíticos capazes de reconhecer alvos específicos (sequências nucleotídicas de RNA ou DNA) e modificá-los. Em geral, essas modificações estão associadas à clivagem específica de sítios na molécula-alvo. As funções das ribozimas são: excisão de íntrons, atividade endonuclease específica para determinadas sequências, nucleotídeo transferase, fosfatase, cinase, glucano transferase, entre outras.

Atualmente, as ribozimas representam uma ferramenta eficiente de inibição gênica, tendo como único requerimento prévio a sequência de DNA cujo produto gênico se quer inativar (Capítulo 14).

Telomerase

A telomerase é uma ribonucleoproteína (RNP) que catalisa a síntese de DNA telomérico. Os telômeros são

estruturas localizadas nas extremidades dos cromossomos que previnem eventos de recombinações cromossômicas errôneas e reparo, mantendo a extremidade do cromossomo linear estável. Na maioria dos eucariotos, o DNA telomérico consiste em uma sequência simples rica em guanina (TTAGGG), que é repetida consecutivamente (em *tandem*). O número e a sequência são espécie-específicos.

A sequência rica em guanina atrai para si a sequência rica em citosina presente na extremidade 3', formando uma estrutura de fita simples (em forma de grampo) na extremidade do cromossomo. A alça formada pela extremidade 3' da fita simples invade a região de sequências repetidas da dupla fita, estabelecendo pares de bases entre a fita simples e a fita complementar da dupla fita invadida. Em células de mamíferos, as repe-

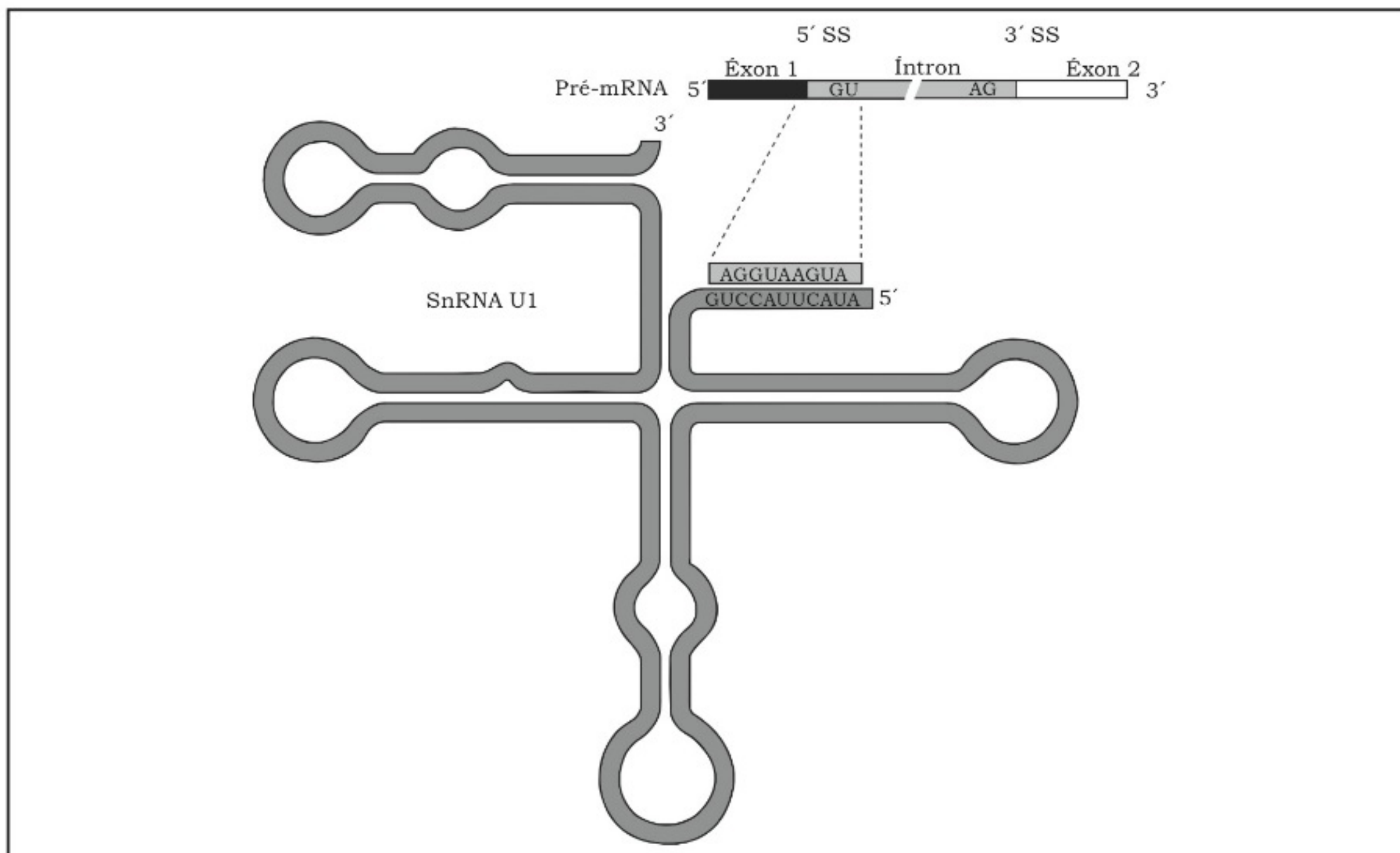


Figura 2.10 – Esquema representativo de pequenos RNA nucleares (snRNA), mais especificamente a U1. Apresenta as regiões estruturais de complementariedade ao longo da cadeia de ribonucleotídeo. Observa-se na extremidade 5' do polímero o sítio de interação com a região intrônica a ser removida do RNA nuclear, durante o processo de *splicing*. Modificado de Cooper, 2001.

tições teloméricas de DNA dupla-fita são ligadas diretamente por meio dos fatores de ligação de repetição telomérica 1 e 2 (TRF-1 e TRF-2). Por outro lado, a subunidade RNA da telomerase é utilizada como molde para a síntese de repetições teloméricas.

A fita simples da extremidade 3' de um telômero é estendida por meio da telomerase, neutralizando a inabilidade do mecanismo de replicação do DNA para sintetizar a terminação extrema do DNA linear. A telomerase liga-se à extremidade da fita simples por meio de um mecanismo de transcrição reversa (Fig. 2.11).

Propriedades Físico-químicas dos Ácidos Nucleicos

Os ácidos nucleicos podem ser dissociados por processos físicos e químicos. Em condições fisiológicas, a estrutura de dupla hélice do DNA é bastante estável. Contudo, se essa estrutura for submetida a aquecimento em temperatura superior a 90°C ou aumento de pH, as pontes de hidrogênio são rompidas em sua totalidade e a molécula sofre um processo denominado desnatura-

ção ou dissociação (*melting*, do inglês) no qual as fitas complementares são separadas (Fig. 2.12).

O processo de desnaturação pode ser revertido por meio da redução da temperatura (inferior a 65°C) ou neutralização do pH (próximo de 7,0). Dessa forma, as fitas complementares voltam a formar a estrutura de dupla hélice. Esse processo é denominado reassociação ou *annealing* (Fig. 2.12).

O fato de ocorrer a reação de reassociação ou de hibridação, sempre que moléculas de DNA desnaturadas e/ou DNA/RNA complementares forem colocadas em condições favoráveis de formação de pontes de hidrogênio, promovendo a formação de moléculas de dupla fita (DNA/DNA e ou DNA/RNA) favorece a identificação de sequências nucleotídicas e consequentemente possibilita a detecção e caracterização de segmentos gênicos diferentes.

Esta propriedade química dos ácidos nucleicos é a base para muitas técnicas investigativas da Biologia Molecular, tais como: *Southern-blotting*, *Northern-blotting* (Capítulo 6), ensaio de nuclease S1, *dot-blot* e *arrays*

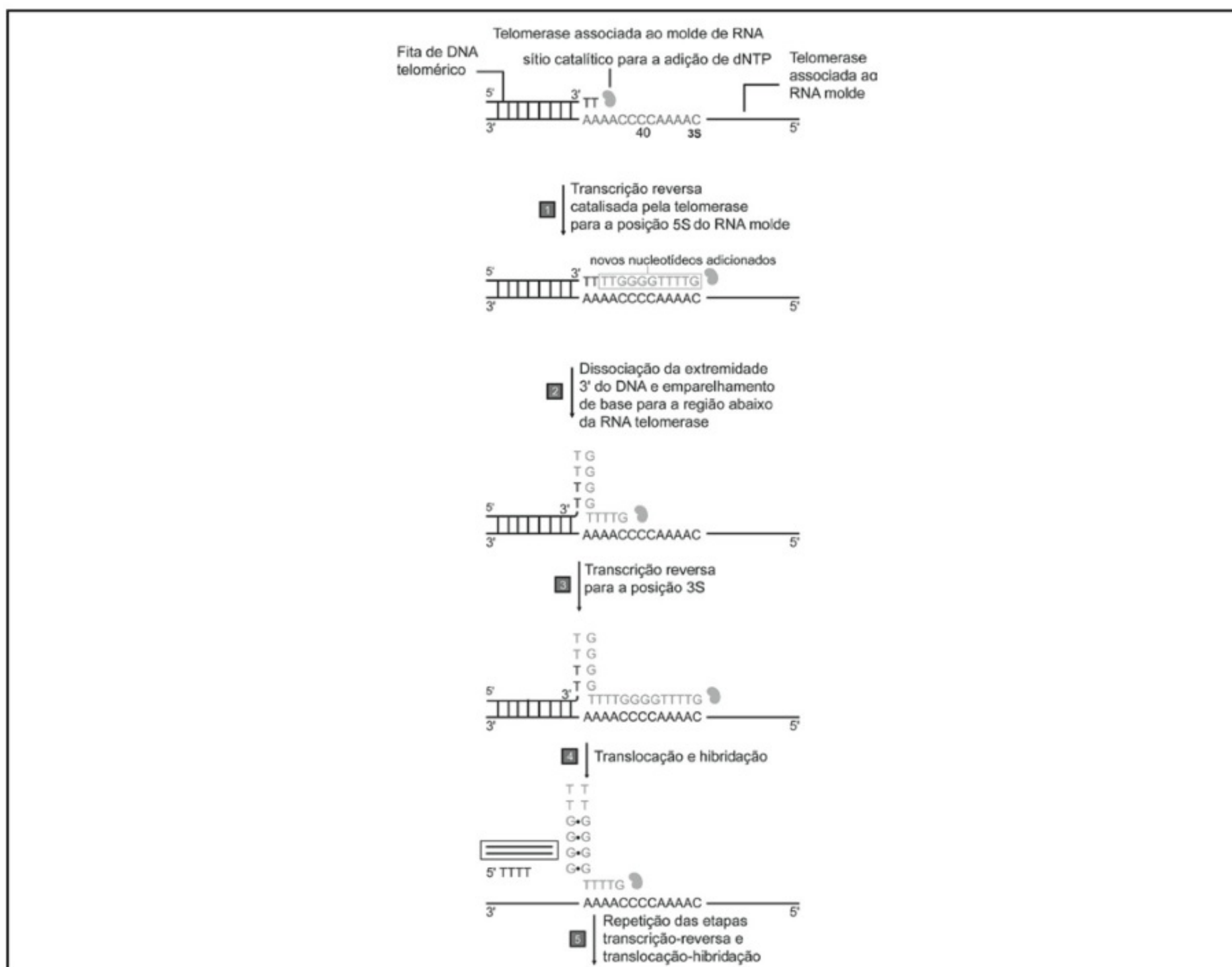


Figura 2.11 – Esquema representativo do mecanismo de ação da telomerase. É descrito que a ação da telomerase do protozoário *Oxytricha* adiciona uma unidade T4G4; outras telomerases adicionam diferentes sequências de sinais. A telomerase contém um RNA molde que adiciona pares de base na extremidade 3' da fita molde complementar; ela catalisa a região e então adiciona desoxinucleotídeo usando a molécula de RNA como um molde (1). As fitas resultantes do conjunto DNA-RNA deslizam conduzindo ao deslocamento de uma fita telomérica de DNA para expor parte da sequência do RNA molde (2). A sequência da fita telomérica é novamente estendida para a posição 35 da telomerase e submetida à translocação e hibridação (3 e 4). O mecanismo é facilitado por bases pareadas não usuais no deslocamento dos resíduos G, que são menos estáveis do que as bases pareadas Watson-Crick. Modificado de Lodish et al., 2005.

(Capítulo 7), ensaio de proteção de RNase (Capítulo 8), PCR e RT-PCR (Capítulo 9), PCR em Tempo Real (Capítulo 10), SAGE (Capítulo 12), RNAi (Capítulo 14) e EMSA (Capítulo 34), entre outras.

Replicação e Transcrição de DNA

Replicação do DNA

Toda vez que uma célula se divide, o conteúdo de DNA é duplicado na íntegra, transmitindo em absoluto as informações genéticas da célula-mãe para a célula-filha. Esse processo denomina-se replicação e ocorre de forma semiconservativa, ou seja, as duas cadeias precursoras (DNA de dupla fita, dsDNA) servem de molde

para a síntese da nova cadeia (Fig. 2.13). Dessa forma, para a replicação ocorrer, é necessário que a dupla fita precursora se abra, formando 2 cadeias independentes (DNA fita simples, ssDNA), as quais são replicadas pela ação da DNA polimerase em associação com uma série de outras enzimas (helicase, primase, topoisomerasas, DNA ligase, entre outras) e proteínas (SSB-proteínas que se ligam à fita simples) (Fig. 2.13).

Existem diferentes tipos de DNA polimerases, entre elas: alfa, beta, gama e épsilon. A DNA polimerase gama está localizada na mitocôndria e é responsável pela replicação do DNA mitocondrial. As demais estão localizadas no núcleo, sendo alfa, gama e épsilon as mais ativas na divisão celular, sugerindo que elas estejam en-

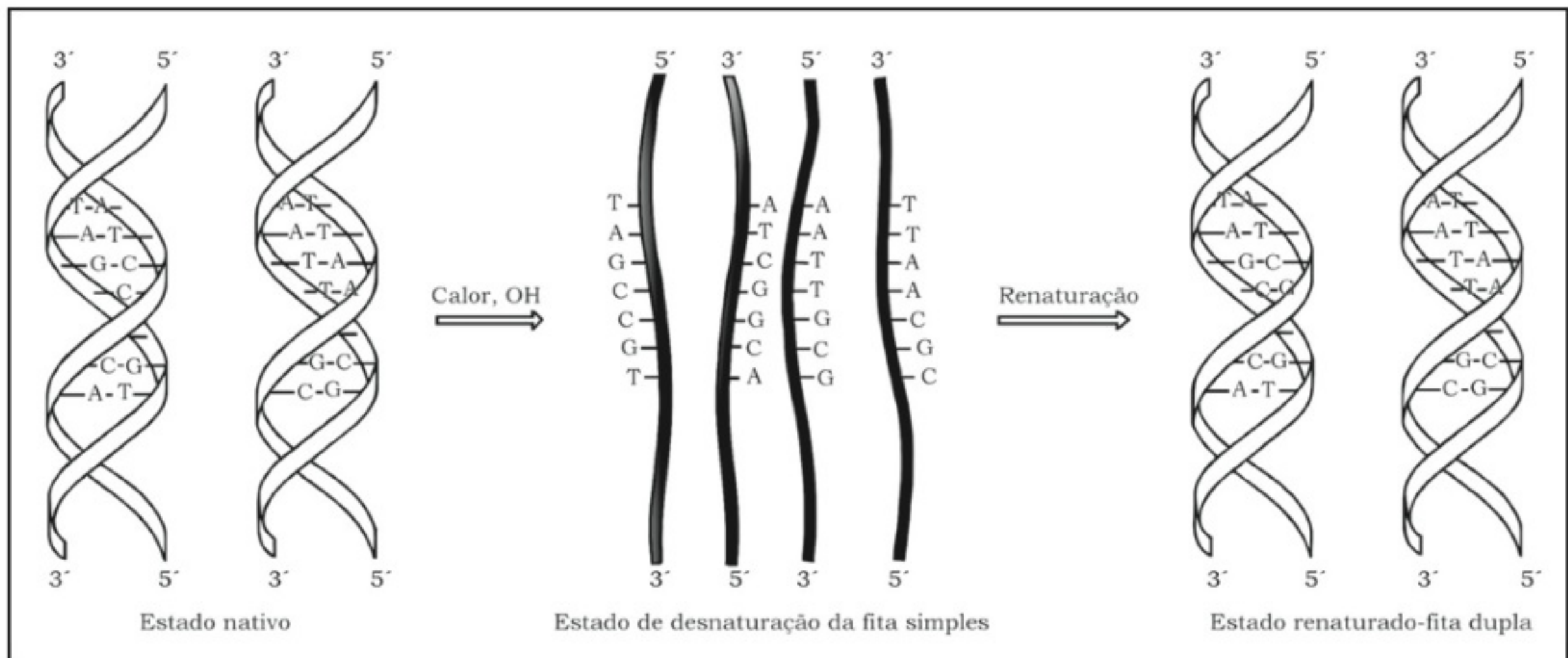


Figura 2.12 – Desnaturação e renaturação de moléculas de DNA de fita dupla. Modificado de Lodish et al. 2005.

volvidas na replicação. Já a beta é mais ativa na célula que não se encontra em divisão, sugerindo que sua função primária esteja envolvida no reparo do DNA.

A adição dos nucleotídeos pela DNA polimerase inicia-se a partir da região 5' da molécula de DNA em direção à região 3'. Dessa forma, em uma das fitas do DNA, a replicação ocorre de maneira contínua (Fig. 2.13). Enquanto, na fita antiparalelas esse processo ocorre de forma descontínua dando origem ao chamado fragmento de Okazaki em homenagem ao pesquisador Reiji Okazaki que descreveu este fenômeno (Fig. 2.13) que posteriormente são unidos pela ação da DNA ligase.

Várias enzimas são necessárias para a replicação do DNA na *E. coli*. A DNA polimerase requer um *primer*, sem o qual a enzima não é capaz de iniciar a síntese de novo. O *primer* é fornecido por uma RNA polimerase, chamada *primase*, que, em associação com o complexo de proteínas primossomo, sintetiza uma pequena extensão de RNA. A proteína helicase (originalmente chamada *rep*) é necessária para desenrolar a hélice de DNA, permitindo a replicação. Uma proteína ligante ao DNA de fita simples (ssDNA-ligante) é também necessária para estabilizar as regiões de DNA de fita simples, que são transitoriamente formadas durante o processo de replicação. Finalmente, uma vez que a DNA polimerase sintetiza o DNA somente na direção de 5'→3', uma das fitas deve ser sintetizada descontínuamente (fita descontínua ou *lagging strand*). Esse processo leva à produção de uma série de pequenos fragmentos de DNA com lacunas entre eles. As lacunas são preenchidas pela ação de DNA polimerase I e os fragmentos são ligados pela ação da DNA ligase (Fig. 2.13).

A replicação do DNA tanto em procariotos quanto em eucariotos inicia em pontos específicos da sequência de nucleotídeos. No caso dos procariotos, essas sequências são conhecidas como origem de replicação (*oriC*), local no qual proteínas envolvidas no processo de replicação e a DNA polimerase ligam e iniciam o processo de replicação. Nos eucariotos, existem múltiplas origens de replicações.

Transcrição Gênica

Os genes representam sequências de ácido nucleico, necessárias para a síntese de um polipeptídeo funcional, que estão presentes ao longo da fita de DNA. Os genes estão estruturados em sequências funcionais, éxons, que muitas vezes se encontram intercaladas com sequências de nucleotídeos não funcionais, os íntrons. Ambos são transcritos para produzir um longo transcrito de RNA primário; e, então, os íntrons são removidos (*splicing*) para formar o mRNA maduro.

Apenas uma das fitas de DNA é transcrita dando origem a uma única sequência de mRNA para cada gene. A indicação de qual fita do DNA deve ser transcrita é orientada por sequências específicas, as quais são denominadas de região promotora. Essas regiões são constituídas por sequências-consenso de nucleotídeos, por exemplo *TATA box* (TATATA), presentes em diferentes genes bem como entre espécies, localizadas acima da sequência de cada gene (Fig. 2.14A).

De modo geral, a transcrição dos genes envolve a participação de fatores de transcrição (TF) envolvidos no reconhecimento da região promotora e na ativação

da RNA polimerase, denominados de TF basais (Fig. 2.14B), como, por exemplo, fator de transcrição da polimerase II – TFIID. No processo de transcrição, também participam proteínas, como a de ligação ao TATA box (TPB), bem como a presença da RNA polimerase que reconhece as regiões promotoras, dando início a transcrição do gene.

A RNA polimerase catalisa a polimerização dos ribonucleosídeos 5' trifosfato (rNTPs), ligando-os à extremidade 3' da cadeia de mRNA em crescimento. A polimerização ocorre na direção 5'→3', portanto, cada molécula de mRNA será idêntica à sequência nucleotídica da fita de DNA que não é transcrita (Fig. 2.14C).

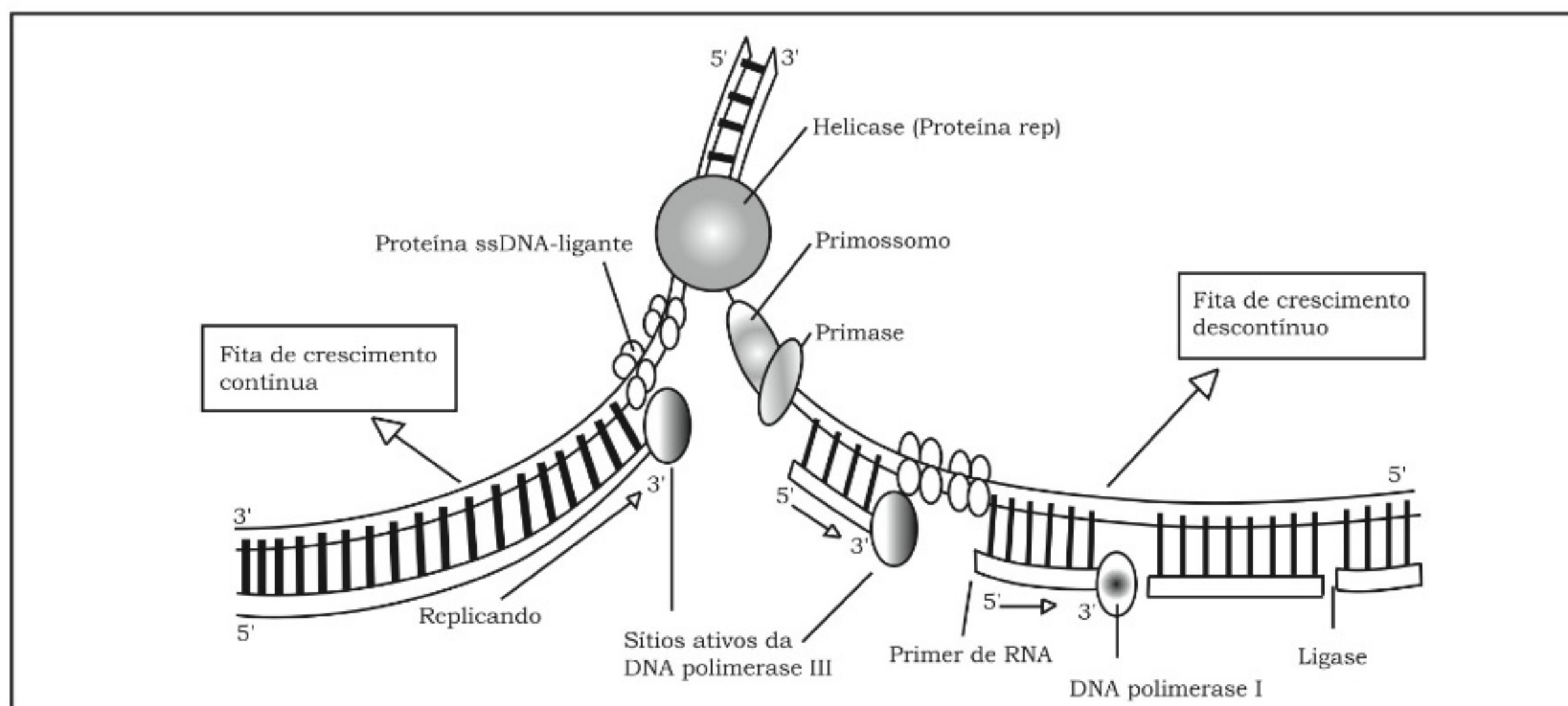


Figura 2.13 – Esquema ilustrativo da replicação semiconservativa do DNA (replicação do DNA na *E. coli*). A DNA polimerase III pode assumir o comando e usar o RNA como um *primer* para continuar a síntese; de DNA. A rep desenrola a hélice de DNA, permitindo a replicação, e a ssDNA-ligante estabiliza as regiões de DNA de fita simples. Assim, ocorre a produção de uma série de pequenos fragmentos de DNA com lacunas entre eles. As lacunas são preenchidas pela ação da DNA polimerase I e os fragmentos são ligados pela ação da DNA ligase. Modificado de Watson et al. 1992.

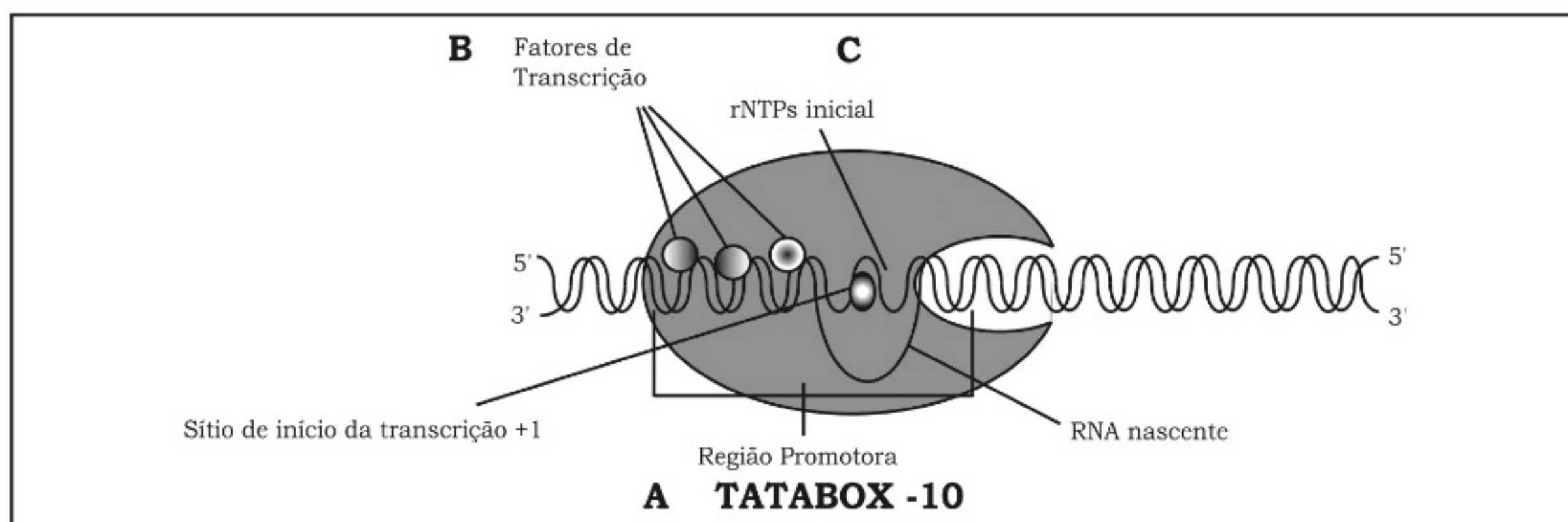


Figura 2.14 – Esquema ilustrativo do processo de transcrição. (A) Região promotora localizada a aproximadamente 10 pares de bases antes do sítio de início da transcrição (procariotos), ou seja, antes da região codificadora, sendo indicado com o número 1 positivo, e a região promotora, com números negativos. (B) Fatores de transcrição envolvidos no reconhecimento da região promotora e ativação da RNA polimerase. (C) O polímero de RNA é formado a partir da adição dos ribonucleotídeos na direção 5'→3', tendo como guia a complementaridade com as bases presentes na fita molde de DNA. Modificado de Lodish et al., 2005.

Até o momento, foram descritos três diferentes tipos de RNA polimerase (I, II e III), os quais estão envolvidos na transcrição de diferentes genes em células eucarióticas. As RNA polimerases nucleares são complexos enzimáticos constituídos de 8 a 14 diferentes subunidades cada. A RNA polimerase I sintetiza os pré-rRNAs que originam os rRNAs 18S, 5,8S e 28S. A RNA polimerase II sintetiza os RNA heteronucleares e snRNA (U1, U2, U4, U5) que atuam no processo de *splicing*. A RNA polimerase III sintetiza os tRNA, rRNA 5S, rRNA 7S e alguns snRNA. O crescimento da cadeia de RNA é finalizado quando um sinal de terminação é encontrado. Assim, a transcrição do DNA é interrompida, o mRNA é liberado e a RNA polimerase dissocia-se do DNA molde. Em bactérias, esse sinal de terminação é representado por uma sequência simétrica invertida rica em GC, seguida de quatro ou mais nucleotídeos de A. Essa repetição de bases invertidas resulta em um segmento de RNA que pode formar uma estrutura em alça estável por meio da complementariedade do pareamento de bases (Fig. 2.15).

Outros tipos de sinais de terminação de transcrição, tanto em célula eucarióticas quanto procarióticas, dependem da ligação de proteínas que terminam a transcrição em sequência específica de DNA, em vez da formação de estruturas em alça no RNA.

Regulação da Transcrição

A transcrição do DNA também pode ser regulada por outras sequências *cis-regulatórias* que são sítios de ligação para uma variedade de fatores que controlam a expressão de genes individuais. Essas sequências regulatórias são frequentemente localizadas a montante (*upstream*) da região promotora (TATA *box*). Exemplo desse tipo de sequências regulatórias são as sequências consenso CCAAT e GGGCGG, denominado de GC *box*. Proteínas específicas ligam-se a essas sequências e estimulam a transcrição.

Vários genes presentes nas células de mamíferos são regulados por sequências regulatórias mais distantes (algumas vezes mais de 10 quilobases do sítio de início da transcrição). Essas sequências são denominadas de intensificadores (*enhancers*). As interações dessas regiões com a região promotora ocorrem pela ligação de TF específicos e formação de uma alça (*looping*) na sequência de DNA da região promotora, que juntamente com os fatores de transcrição basais aumentam a taxa de transcrição gênica (Fig. 2.16).

Ao TATA *box* se liga a TBP (TATA *binding protein*), um componente-chave do fator de transcrição II D (TFIID, *transcription factor II D*). Em cooperação com

outros TFIIIs e fatores gerais de transcrição, o TFIID forma com a RNA polimerase II o complexo de transcrição (Fig. 2.16).

Processamento de mRNA

O mRNA heteronuclear (hnRNA, pré-mRNA) que contém éxons e íntrons (nos eucariotos) recém sintetizados sofre uma série de modificações até se tornar o transcrito final (mRNA) e ser transportado para o citoplasma, onde juntamente com a maquinaria de tradução (rRNA, tRNAs e fatores de tradução) tem suas informações decodificadas em proteínas.

A primeira modificação que a molécula de pré-mRNA sofre, após a síntese, envolve a adição de uma estrutura denominada capacete G (Cap G). Esse processo tem início com a adição de um guanilato na orientação reversa do nucleotídeo terminal 5' do pré-mRNA (ligação 5'-5'). Em seguida, ocorre a adição de grupos metil no resíduo de guanilato (Fig. 2.17) e na porção da ribose de ou 2 nucleotídeos na extremidade 5' da cadeia de pré-mRNA.

A segunda modificação do pré-mRNA que ocorre é a adição de uma série de adeninas na extremidade 3' (cauda de poli-A). A adição da cauda de poli A envolve a clivagem da extremidade 3' por uma endonuclease que produz um grupamento OH-3' livre e a adição de resíduos de ácido adenílico pela enzima *poli (A) polimerase*. A cauda poli A promove estabilidade à molécula do pré-mRNA, protegendo-a do ataque de enzimas e facilita o reconhecimento do mRNA pelo RNA ribossômico (Fig. 2.18).

A terceira modificação do pré-mRNA é a remoção dos íntrons que se dá por um processo denominado processamento (*splicing*) de RNA. O *splicing* é catalisado por um complexo ribonucleoproteico designado *spliceosome*. Cinco partículas de snRNP (U1, U2, U4, U5 e U6) fazem parte do complexo, formando um centro ativo responsável pela remoção do íntron (Fig. 2.19).

A formação do *spliceosome* requer o reconhecimento de dois sítios de *splice* específicos: 1. sítio *splice* 5' (5'SS) na sequência consenso que inclui um dinucleotídeo conservado (GU) na extremidade 5' do íntron; 2. sítio *splice* 3' (3'SS) que consiste do sítio ramificado, região de polipirimidina, e um dinucleotídeo conservado (AG) na extremidade 3' do íntron.

Na figura abaixo (Fig. 2.19) estão representados os éxons (E1 e E2) expressos em forma de retângulos, íntrons por linhas e partículas de pequenos RNA nucleares (snRNP) por círculos. A posição relativa dos snRNPs no complexo de *splicing* são arbitrários.

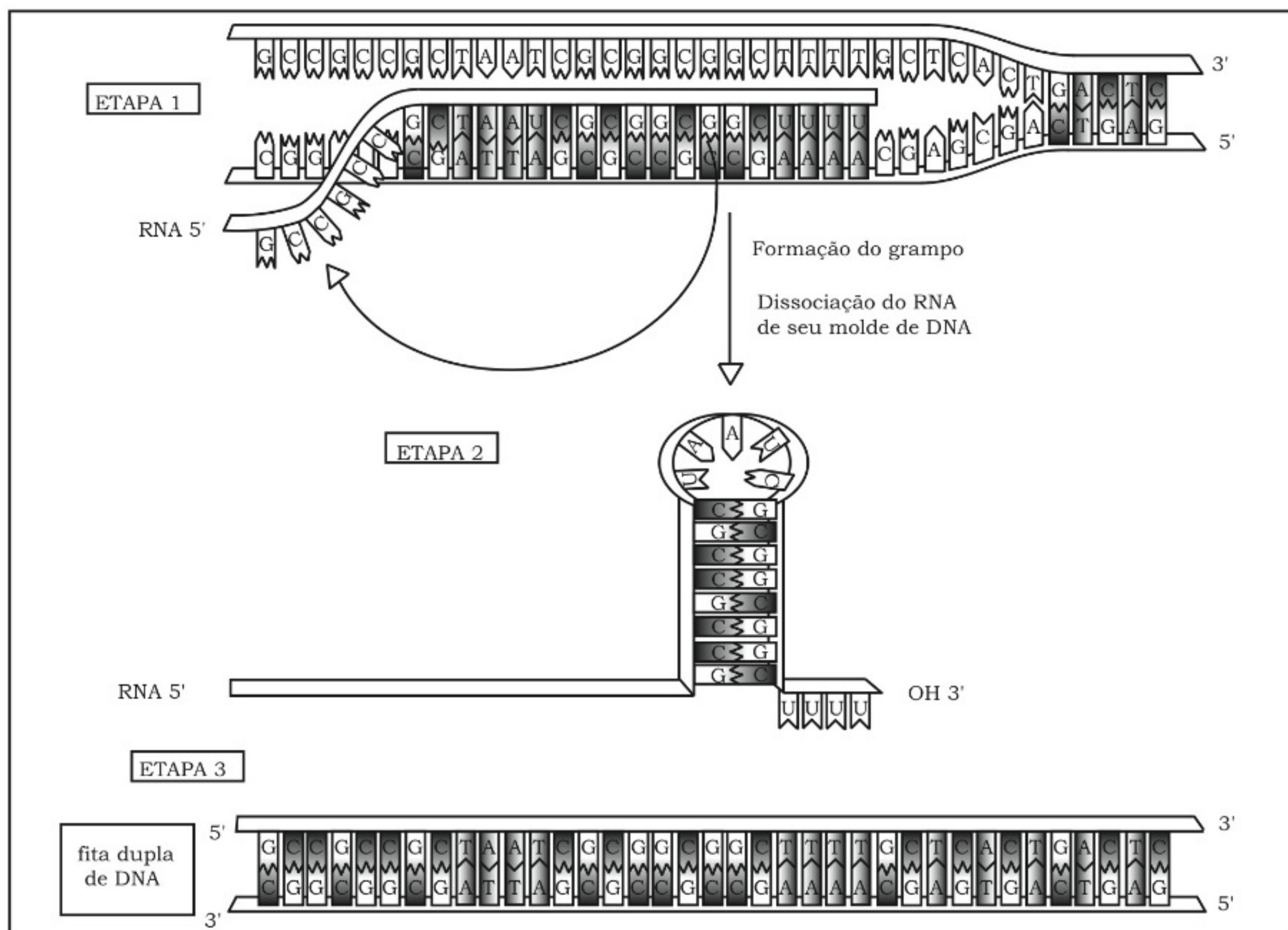


Figura 2.15 – Esquema que representa o término da transcrição. Etapa 1 – O término da transcrição é sinalizado por uma região repetida e invertida rica em GC, seguida de quatro resíduos de A. Etapa 2 – Após a síntese dessa região pela RNA polimerase, as repetições invertidas rica em GC formam uma estrutura estável em grampo no RNA. Etapa 3 – Como resultado, ocorre a dissociação da fita de RNA recém-sintetizada do molde de DNA. Modificado de Cooper, 2001.

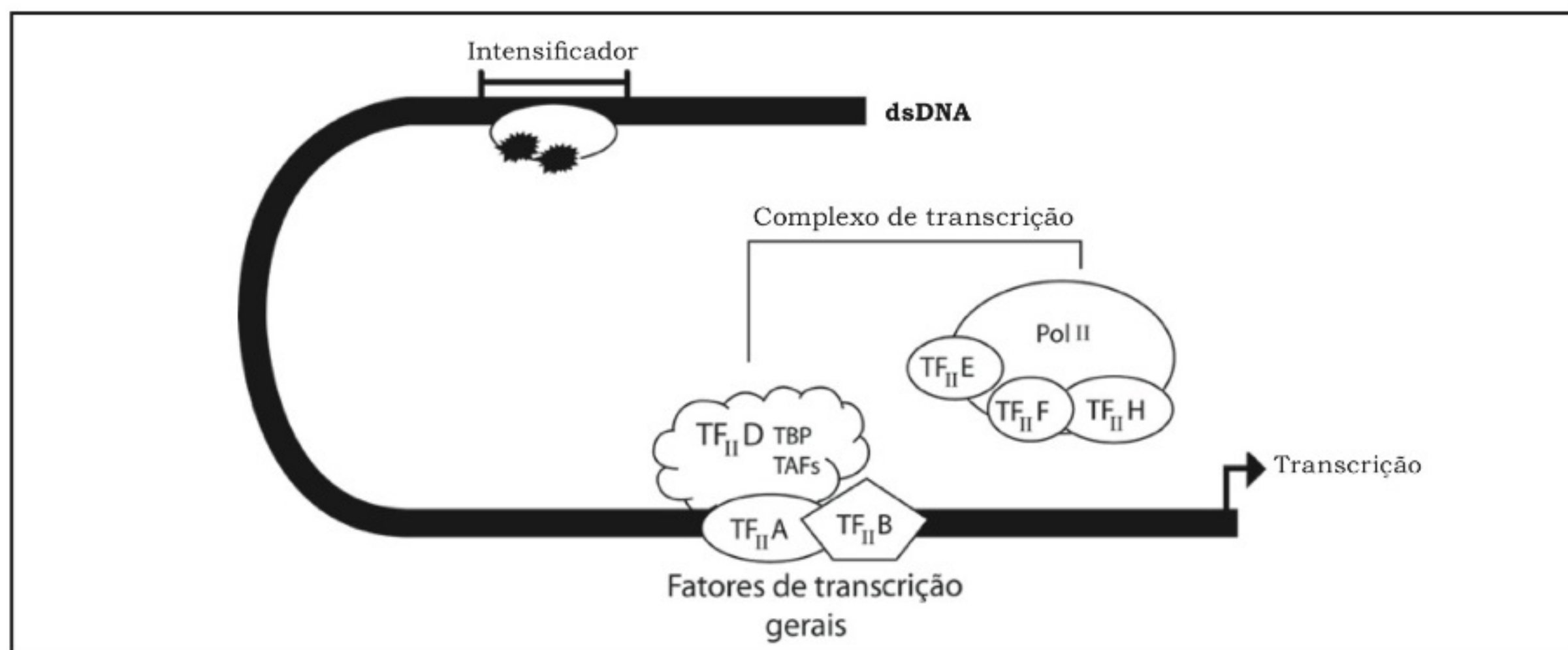


Figura 2.16 – Modelo geral do complexo de transcrição. Interações entre a RNA polimerase II e os fatores gerais de transcrição são cruciais para que ocorra transcrição em níveis basais. Elementos mais distais, dentre os quais temos os *enhancers*, ligam-se a fatores mais específicos e aumentam a taxa de transcrição de genes específicos. Modificado de Lin e Barbosa, 2002.

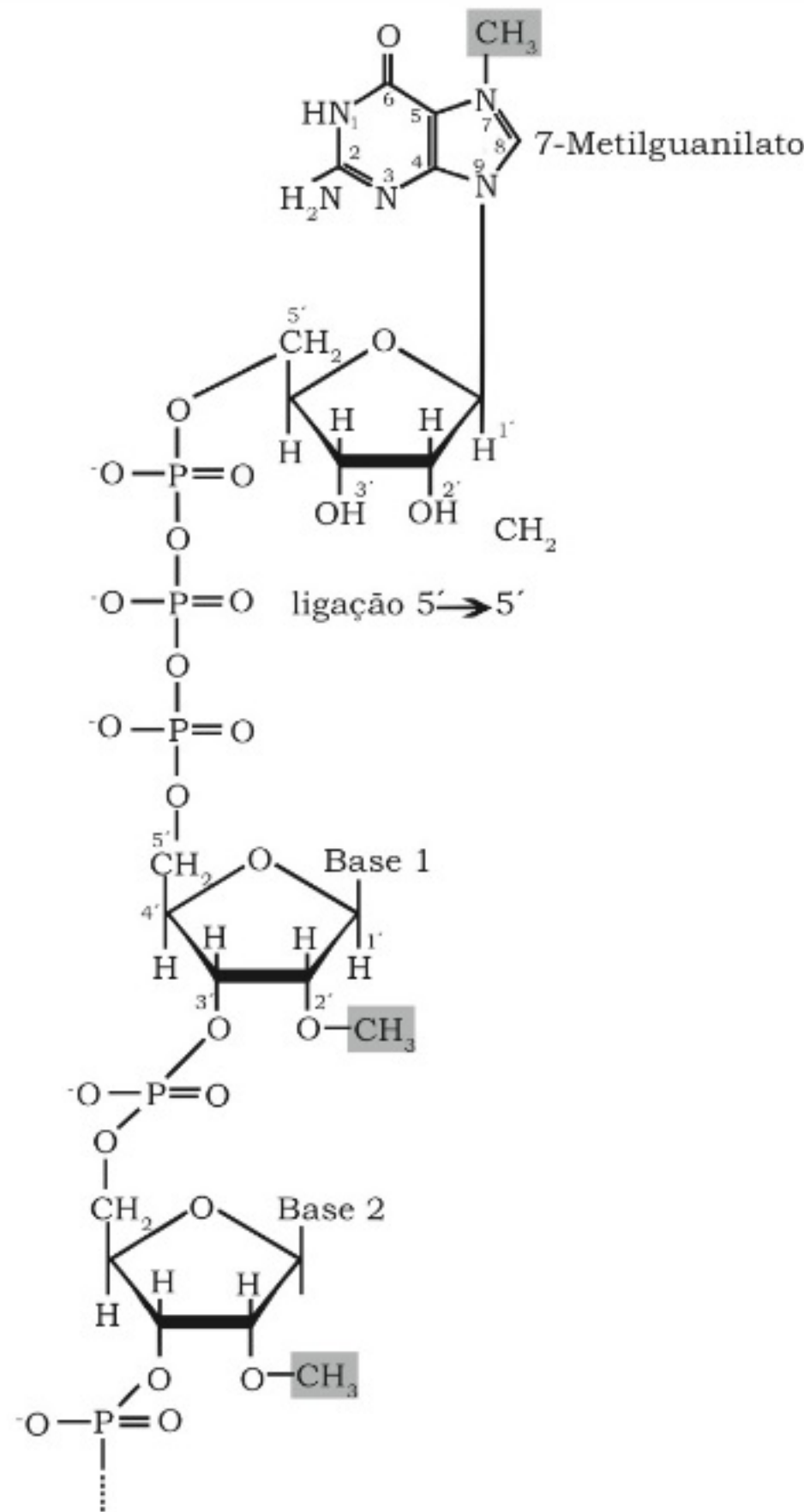


Figura 2.17 – Representação esquemática da adição do Cap na extremidade 5' do mRNA de eucariotos. Na extremidade 5' do RNA recém-formado é adicionado um guanilato na orientação reversa (ligação 5'-5'), com posterior adição de grupamento metil na posição 7' do nucleotídeo (7-metilguanilato). Modificado de Lodish et al., 2005.

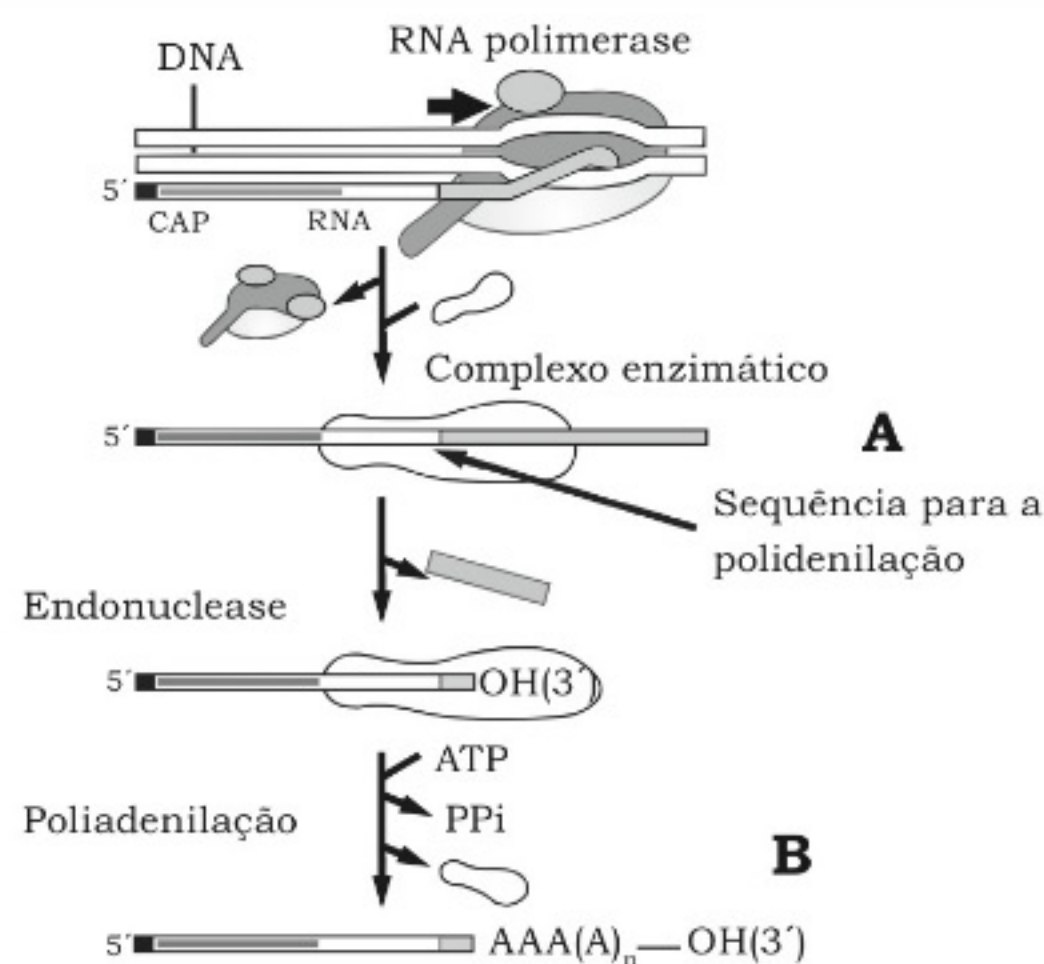


Figura 2.18 – Etapas da adição da cauda de poli(A) na extremidade 3' do mRNA de eucariotos. **(A)** Inicialmente, uma endonuclease cliva a extremidade 3' do RNA removendo os nucleotídeos até próximo à sequência sinalizadora para poliadenilação, na qual há gasto energético, finalizando com a presença do OH livre. **(B)** Na sequência, a enzima *poli(A) polimerase* adiciona uma série de bases de AA. Modificado de Lewin, 2004.

O estágio inicial do processamento de mRNA envolve a formação concomitante de um complexo composto de snRNP U1 e proteínas não snRNP (Fig. 2.19, etapa 1). Subsequentemente, é formado o complexo *splicing* A que contém snRNP U2 ligado a sequências do sítio ramificado do pré-mRNA (Fig. 2.19, etapa 2). O complexo A é então convertido no complexo B por meio da associação com os snRNPs U4, U5 e U6 (Fig. 2.19, etapa 3). Este passo envolve a perda da estabilidade do snRNP U1 no *spliceosome*. O rearranjo subsequente leva à formação do complexo C que está associado com a liberação do snRNP U4 do *spliceosome* e concomitantemente ocorre o primeiro passo do *splicing* (Fig. 2.19, etapa 4) que é a clivagem no 5'SS, e a formação de uma alça IVS-3' éxon intermediária. Finalmente, a alça de íntron e os éxons de mRNA *spliced* são gerados. A alça de íntron é encontrada no complexo I que contém snRNPs

U2, U5 e U6 (Fig. 2.19, etapa 4). Esse mecanismo de processamento de mRNA foi descrito como sistemas altamente homólogos de leveduras (Konarska, 1998).

Alguns tipos de RNA sofrem modificação adicional na sequência de oligonucleotídeos, denominada edição de mRNA. As reações de edição ocorrem em muitos organismos e processam-se por meio de mecanismos de inserção, deleção ou substituição de nucleotídeos. O primeiro caso descrito de edição de RNA foi a inserção ou deleção de nucleotídeos de uridina no mRNA mitocondrial de *Tripanosoma cruzi* que codifica proteínas funcionais. A conversão de bases parece ser o tipo mais comum de edição de RNA no núcleo de eucariotos superiores, e as reações mais bem caracterizadas são desaminações hidrolíticas, nas quais a citidina (C) e a adenosina (A) são convertidas em uridina (U) e inosina (I), respectivamente (Fig. 2.20).

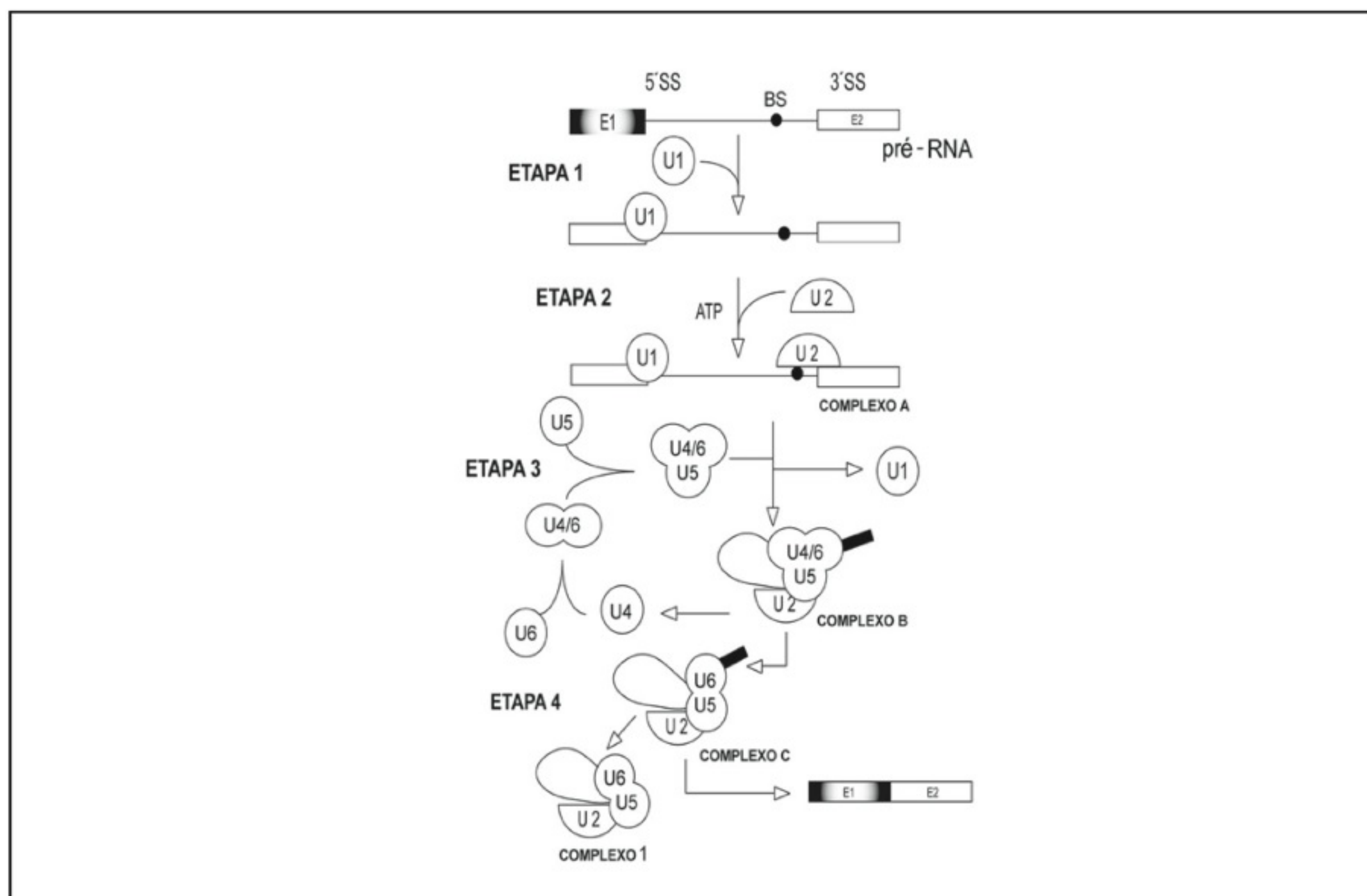


Figura 2.19 – Representação esquemática da junção da via *spliceosome*. O snRNP U1 liga-se ao sítio de sinalização 5' do *splice*, que inclui um dinucleotídeo conservado GU no fim 5' (5'SS), bem como proteínas não snRNP. Concomitantemente na extremidade 3' liga-se o snRNA U2 (complexo A). Posteriormente, o complexo A é convertido em complexo B pela associação dos snRNP U4/U5/U6. Este passo envolve uma aparente desestabilização do U1 a partir do *spliceosome*. Subsequentemente ocorre rearranjo do complexo que conduz a formação do complexo C, o qual está associado com a liberação do U4 a partir do *spliceosome*, e concomitantemente ocorre o primeiro passo do *splicing* que é a clivagem no 5'SS e a formação de uma alça éxon IVS-3' intermediário. Finalmente, a alça íntron e éxon mRNA *spliced* são gerados. A alça íntron é encontrada no complexo I, contendo U2, U5 e U6 snRNPs (modificado de Konarska, 1998).

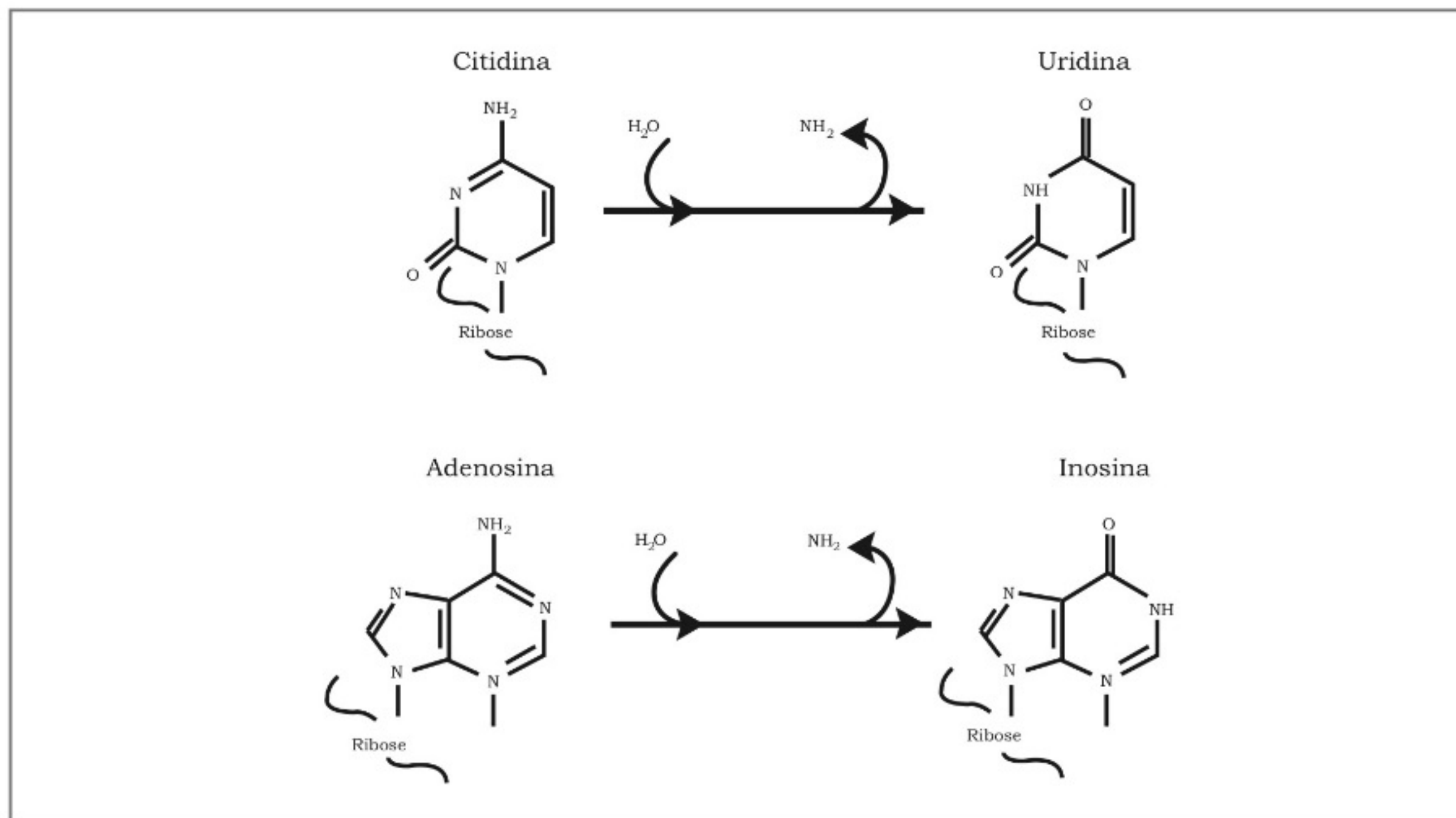


Figura 2.20 – Conversão de adenosina e citidina para inosina e uridina, respectivamente. Desaminação hidrolítica no carbono-6 (C6) da adenosina transforma-a em inosina. A reação requer a formação de um intermediário tetravalente e resulta na liberação de amônia. Modificado de Schaub e Keller, 2002.

O nucleosídeo inosina (IMP) foi primeiramente observado no tRNA citoplasmático e posteriormente em pré-mRNA de transcritos virais. Foi estimado que o IMP estivesse presente em altas quantidades no RNA poli(A⁺), particularmente no cérebro, onde um IMP está presente em 17.000 nucleotídeos, sugerindo uma importante função para a desaminação da adenosina. Contudo, o significado dessas modificações em tRNA ou pré-mRNA ainda precisa ser completamente elucidado. Acredita-se que a inosina em anticódons tRNA tem uma função crucial na tradução por expandir a capacidade de reconhecimento do códon, aumentar a eficiência de decodificação e prevenir deslocamento de fita (*frameshift*).

A conversão de A para I na codificação de pré-mRNA ou de sequências não codificadoras (íntrons, UTRs) pode alterar a especificidade de um códon ou afetar o *splicing*, gerando isoformas de proteínas com diferentes funções não esperadas a partir da sequência genômica. Desse modo, a edição de RNA contribui para o conceito de que o número de genes não seja o principal determinante da diversidade de mRNA e proteínas em um organismo.

Exemplo clássico da edição de mRNA é a geração de apolipoproteína B-48 a partir do mRNA do gene da

apolipoproteína B-100, que tem importante função no metabolismo exógeno dos lipídios plasmáticos. A edição do mRNA da apolipoproteína B (APOB) envolve a desaminação sítio-específica da citidina 6666, a uridina, no códon da glutamina (CAA), que gera um códon de interrupção de tradução (*stop codon*) (Fig. 2.21).

Nesse processo participam o substrato de mRNA e dois fatores de complementação APOBEC-1 e APOBEC-2. Ao término dos estágios de modificação descritos anteriormente, a molécula de mRNA (transcrito final) está pronta para ser transportada por ribonucleoproteínas, do núcleo para o citoplasma, quando é utilizada como molde no processo de tradução.

A compreensão dos mecanismos de replicação e transcrição do DNA e dos processos de maturação e processamento do mRNA, assim como das proteínas e enzimas envolvidas nos processos, foi possível em decorrência dos avanços tecnológicos na Biologia Molecular. Essa tecnologia tem permitido sintetizar e marcar sequências de nucleotídeos *in vitro*, contribuindo significativamente para o avanço das investigações científicas nas áreas da genômica e transcriptômica, ampliando cada vez mais o conhecimento dos organismos vivos e sua interação com o meio ambiente.

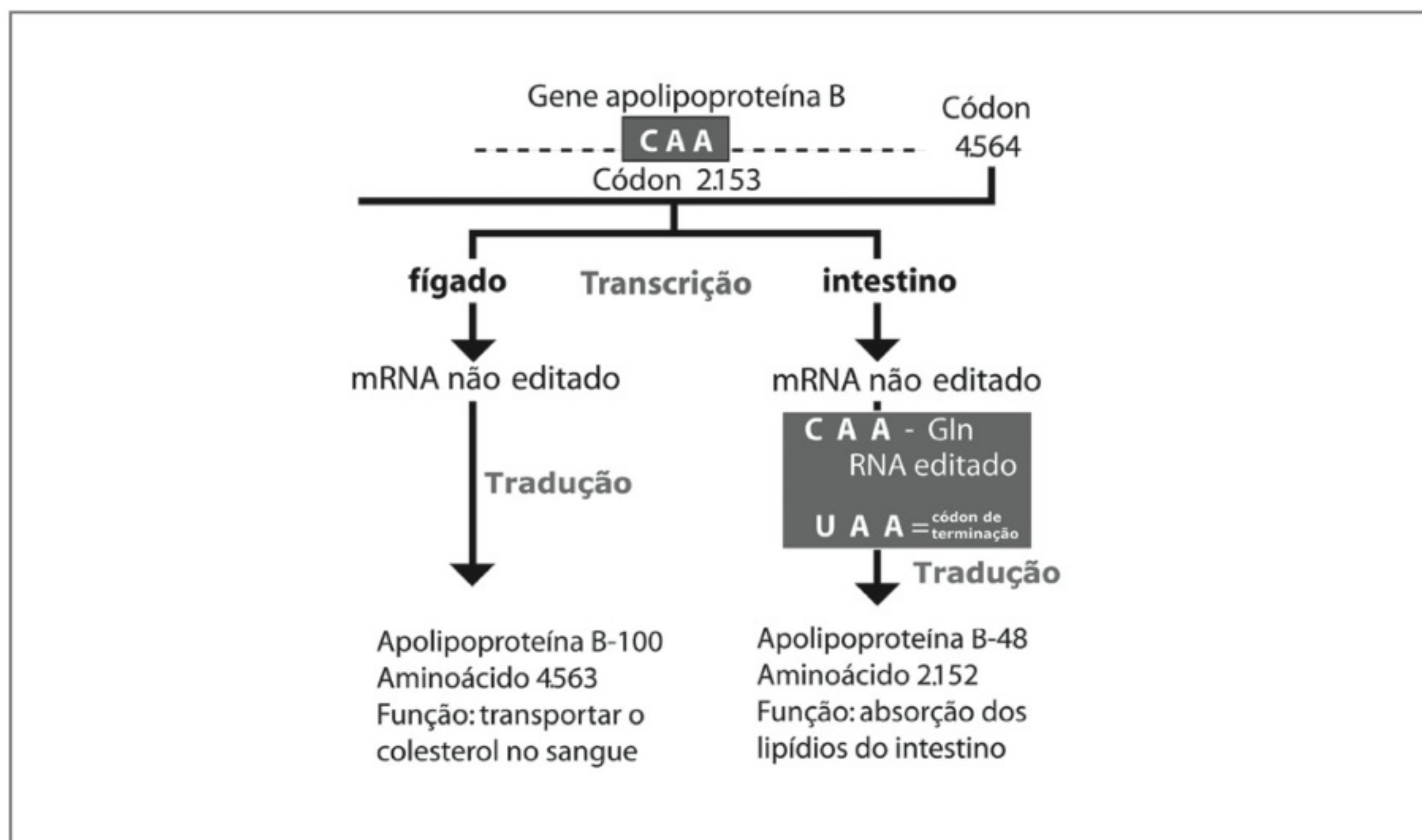


Figura 2.21 – Processo de editoração da apolipoproteína B (APOB). Esquema indicativo dos códons com destaque para o códon 2.153, sítio de editoração do mRNA quando da síntese da apoliproteína B nas células do intestino. Quando a apoliproteína é sintetizada no fígado, não ocorre a editoração do mRNA, resultando a proteína em apolipoproteína B-100 com 4563 aminoácido. Quando sintetizada no intestino, há a edição do mRNA, alterando o códon CAA (Glutamina) para o códon UAA (*stop códon*), como consequência têm-se a apolipoproteína B-48 com 2.152 aminoácido (adaptado de: users.rcn.com, acesso em 29/06/2009).

Referências

- Alberts, B.; Bray, D.; Hopkin, K.; Johonson A.; Lewis, J.; Raff, M.; Keith, R.; Walter, P. Fundamentos da Biologia Celular. Cap. 4, 2ª ed., São Paulo: Artmed, p. 175, 2006.
- Colgan, D.F.; Manley, J.L.; Mecahnism and regulation of mRNA polyadenylation. Genes Develop., 11:2755-2766, 1997.
- Collins, K. Mammalian telomers and telomerase. Curr. Opin. Cell Biol., 12:378-383, 2000.
- Cooper, G.M. Fundamentos da Biologia Molecular In: A célula. Uma abordagem Molecular. Cooper, G.M., ed., ARTMED Editora, 2ª ed., Cap. 3, 2001, p.119.
- Cooper, G.M. Replicação, manutenção e rearranjos do DNA genômico. In: A célula. Uma abordagem Molecular. Cooper, G.M., ed., ARTMED Editora, 2ª ed., Cap. 5, 2001, p. 200-250.
- Cooper, G.M. Síntese e processamento de RNA. In: A célula. Uma abordagem Molecular. Cooper, G.M., ed., ARTMED Editora, 2ª ed., Cap. 6, 2001, p. 251-296.
- Cooper, G.M. Síntese, processamento e regulação protéicos. In: A célula. Uma abordagem Molecular. Cooper, G.M., ed., ARTMED Editora, 2ª ed. Cap. 7, 2001, p. 297-335.
- Dresios, J.; Panopoulos, P.; Synetos, D. Eukaryotic ribosomal proteins lacking a eubacterial counterpart: important players in ribosomal function. Mol. Microbiol., 59(6): 1651-1653, 2006.
- Jackson, R.J. Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. Biochem. Soc. Trans., 33(Pt 6): 1231-1241, 2005.
- Konarska, M.M. Recognition of the 5' splice site by the spliceosome. Acta Biochem., Pol., 45(4): 869-881, 1998.
- Lehmann, D.M.; Galloway, C.A.; Sowden, M.P.; Smith, H.C. Metabolic regulation of apoB mRNA editing is associated with phosphorylation of APOBEC-1 complementation factor. Nucleic Acids Res., 34(11):3299-3308, 2006.

- Lewin, B. DNA is the genetic material. In: Gene V. Lewin, B. ed., Oxford University Press, New York, Cap. 4, 1994, p. 87-93.
- Lewin, B. Genes are DNA. In: Gene VIII. Lewin, B. Pearson Prentice Hall, United States of America, Cap. 1, 2004, p. 1-31.
- Lewin, B. Messenger RNA. In: Gene VIII. Lewin, B. Pearson Prentice Hall, United States of America, Cap. 5, 2004, p. 113-133.
- Lewin, B. Proteins synthesis. In: Gene VIII. Lewin, B. Pearson Prentice Hall, United States of America, Cap. 6, 2004, p. 135-166.
- Lin, C.J.; Barbosa, A.S. Técnicas de análise da regulação da transcrição gênica e suas aplicações na endocrinologia molecular. Arq. Bras. Endocrinol. Metab., 46(4): 330-340, 2002.
- Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C.A.; Krieger, M.; Scott, M.P.; Zipursky, S.L.; Darnell, J. Mecanismos básicos da genética molecular. In: Biologia Celular e Molecular. Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C.A.; Krieger, M.; Scott, M.P.; Zipursky, S.L.; Darnell, J., eds. 5ª ed., ARTMED, Porto Alegre, Cap. 4, 2005, p. 100-145.
- Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C.A.; Krieger, M.; Scott, M.P.; Zipursky, S.L.; Darnell, J. Estrutura molecular dos genes e dos cromossomos. In: Biologia Celular e Molecular. Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C.A.; Krieger, M.; Scott, M.P.; Zipursky, S.L.; Darnell, J., eds. 5ª ed., ARTMED, Porto Alegre, Cap. 10, 2005, p. 400-440.
- Muotri, A.R.; Evolução no tubo de ensaio: ribozimas "artificiais". In: Biologia Molecular e Evolução. Natioli, S.R. ed., Holos, Ribeirão Preto, Cap. 3, 2001, p. 27-39.
- O'Reilly, M.; Teichmann, S.A.; Rhodes, D. Telomeres. Curr. Opin. Struct. Biol., 9(1): 56-65, 1999.
- Pestova, T.V.; Hellen, C.U. The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis. Cell. Mol. Life Sci., 57(4): 651-674, 2000.
- Sonenberg, N.; Dever, T.E. Eukaryotic translation initiation factors and regulators. Curr. Opin. Struct. Biol., 13 (1): 56-63, 2003.
- Schaub, M.; Keller, W. RNA editing by adenosine deaminases generates RNA and protein diversity. Biochimie, 84 (8): 791-803, 2002.
- Watson, J.D.; Gilman, M.; Witkowski, J.; Zoller, M. Recombinant DNA. 2ª ed.; New York: Scientific American. Inc., 1992.

Endereços eletrônicos

www.phschool.com (acesso 29/06/2009)

www.uic.edu (acesso 29/06/2009)

<http://users.rcn.com> (acesso 29/06/2009)

3. Tecnologia de Detecção de Ácido Nucleico

*Rozangela Verlengia
Rosario Dominguez Crespo Hirata
Mário Hiroyuki Hirata*

Introdução

As técnicas de investigação de ácidos nucleicos, tais como ensaios de hibridação e os sistemas de amplificação *in vitro* (Capítulos 6, 7, 9 e 10), têm uma etapa de detecção que utiliza moléculas isoladas e/ou complexadas com enzimas e/ou substâncias marcadas que se hibridam ou se ligam aos ácidos nucleicos. As moléculas de detecção são produzidas por sistemas de marcação com isótopos radioativos, substratos colorimétricos, substâncias quimioluminescentes ou fluorescentes. A detecção também pode ser realizada de forma direta com o uso de corantes que se intercalam entre as bases nitrogenadas dos ácidos nucleicos.

Há dois tipos de formatos de ensaios para a detecção de ácidos nucleicos: homogêneos e heterogêneos. Os heterogêneos têm uma ou mais etapas de separação, enquanto os homogêneos são realizados em uma única etapa.

No formato homogêneo, a amostra de ácido nucleico é adicionada ao reagente de detecção em solução. O sinal gerado pela molécula sinalizadora é mensurado e reflete a quantidade de ácido nucleico presente na amostra (Dickson et al., 1995). O formato heterogêneo inclui uma etapa de separação do ácido nucleico presente na amostra. Isto é realizado pela imobilização da molécula em uma fase sólida pela ligação específica, adsorção ou reação química. Os reagentes de detecção são posteriormente aplicados sobre a fase sólida e ligam-se especificamente ao ácido nucleico de interesse. Nesse formato, o excesso de reagente de detecção não ligado é removido por lavagem do sistema, o que reduz o sinal de fundo (background) e aumenta a especificidade do método (Dickson et al., 1995).

A seguir são discutidos alguns dos sistemas de marcação de ácidos nucleicos e moléculas sinalizadoras uti-

lizados na preparação de sondas nucleotídicas e outros reagentes de detecção de ácidos nucleicos.

Marcação de Ácidos Nucleicos

A marcação de ácidos nucleicos é uma tecnologia útil para a detecção direta ou indireta e altamente sensível dessas moléculas em diferentes sistemas biológicos.

O sistema de marcação a ser utilizado nos ensaios depende de vários fatores, tais como estabilidade do marcador, sensibilidade de detecção, rapidez e facilidade de execução e custo total de marcação, reagentes de detecção e sistema de detecção (Kricka, 1999). Além disso, a versatilidade de modificação da marcação quando um conjugado liga uma molécula ligante é também desejável, uma vez que isso pode formar a base dos ensaios homogêneos (de fase única). A marcação pode ser realizada diretamente nos ácidos nucleicos e/ou em seus fragmentos ou em oligonucleotídeos sintéticos, ou indiretamente utilizando a marcação de haptenos secundários, tais como biotina, digoxigenina.

Os ácidos nucleicos marcados são comumente referidos como sondas de hibridação que são empregadas em diversos sistemas de ensaios moleculares, particularmente nos ensaios de hibridação *in vitro*. Segundo Mansfield et al. (1995), vários fatores determinam a conveniência do uso de sondas de hibridação nos ensaios de detecção de ácidos nucleicos (Quadro 3.1).

Vários métodos de marcação direta ou indireta foram descritos para a detecção de ácidos nucleicos em ensaios de hibridação (Quadro 3.2). Nenhum dos marcadores descritos no quadro 3.2 possuem todos os critérios descritos, embora protocolos relativamente simples e que apresentem sensibilidade adequada de sinal foram desenvolvidos.

Quadro 3.1 – Fatores que determinam o uso de sondas de hibridação.

Marcador	<p>A ligação do marcador ao ácido nucleico deve ser fácil utilizando um protocolo simples e reprodutível</p> <p>O sinal do marcador deve ser detectado em baixas concentrações usando protocolos de detecção simples</p> <p>A marcação deve ser estável, permitindo a re-hibridação da sonda</p>
Sonda	<p>A sonda deve ser estável em condições de hibridação, incluindo temperaturas elevadas e detergentes, bem como solventes como a formamida</p> <p>A sonda não deve interferir com o processo de hibridação</p> <p>A sonda deve ser adequada tanto para métodos de hibridação quanto para fases líquida (membranas ou superfícies de silicone ou vidro) e sólida</p> <p>A sonda deve ser estável por longos períodos de armazenamento dos reagentes de detecção não isotópicos</p>
Ensaio	<p>Nos métodos de detecção baseados em enzima, essa deve ser estável e produzir sinais duradouros</p> <p>O protocolo deve ser compatível com análise automática e permitir rápida detecção usando um número mínimo de reagentes e passos analíticos</p> <p>A hibridação da sonda deve ser reversível e de fácil remoção, permitindo a re-hibridação da membrana</p> <p>O sinal de hibridação deverá ser distinguível do da sonda não reativa. Isso elimina a necessidade de remover substratos não tratados ou sondas que possibilitam realizar o ensaio em um tubo único (formato de ensaio homogêneo)</p>

Fonte: Mansfield, et al. 1995.

Quadro 3.2 – Marcadores e tipos de ensaios utilizados para a detecção de ácidos nucleicos.

Ensaio	Sistema de marcação
Detecção radioisotópica	¹²⁵ Iodo ³² Fósforo ³³ Fósforo ³⁵ Enxofre ³ Trício ¹⁴ Carbono
Colorimétrico	Fosfatase alcalina/ <i>p</i> -nitrofenol fosfato (pNPP) Fosfatase alcalina/5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitroazul de tetrazólio (BCIP/NBT) Galactosidase/5-bromo-4-cloro-3-indol galactosídeo (X-gal) Peroxidase/tetraidroclorato de diaminobenzimida (DAB) Peroxidase/diidroclorato de <i>o</i> -fenilenodiamina (OPD) Peroxidase/tetrametil benzidina (TMB)
Quimioluminescência	Luminol e derivados Éster de acridino Fosfatase alcalina/AMPPD Peroxidase/luminol

Continua

Quadro 3.2 – Continuação.

Bioluminescência	<ul style="list-style-type: none"> - Galactosidase/luciferina-β-galactosidase - Fosfatase alcalina/luciferina-o-fosfatase - Glicose-6-fosfato desidrogenase/glicose-fosfato + luciferase - Bacteriana marina
Fluorescência	<ul style="list-style-type: none"> - Fluoresceína - Brometo de etídio - Metil cumarina - Rodamina - Vermelho-texas - Fosfatase alcalina/ BBTP

Fonte: Mansfield et al., 1995; Sambrock e Russell, 2001.

AMPPD = 3-(4-metoxispiro [1,2-dioxetano-3,2'' -tríciclo-] 3.3.1.^{3,7} (decan-4-yl) fenilfosfato dissódico; BBTP, 2'- [2-benzotiazolil]-6'-hidroxibenzotiazol fosfato (AttoPhos, Promega).

Sistemas de Marcação Isotópica

Marcadores Isotópicos

Os isótopos são átomos que apresentam em seu núcleo um número de neutrons diferente do de prótons, alterando a massa atômica do elemento químico. Fisicamente, esses átomos comportam-se de modo diferente, são mais pesados e instáveis, emitindo energia (radiativa). Por outro lado, quimicamente, os isótopos possuem as mesmas propriedades químicas que as dos átomos estáveis, ou seja, com o mesmo número de prótons. Para tornarem-se estáveis, eles emitem partículas de alta energia que pode ser alfa (α); gama (γ) ou beta (β), dependendo da origem da emissão da energia a partir do átomo (para mais detalhes ver Raul dos Santos, 1998). Princípios básicos de proteção radiológica na utilização de materiais radiativos em laboratório, ver Manual de Biossegurança (Colli e Mesquita, 2002).

Os isótopos (molécula sinalizadora) mais frequentemente usados para a síntese de sondas radiativas in-

cluem o fósforo-32 (³²P), o enxofre (³⁵S) e trítio (3H); a escolha destes depende da aplicação e do método de detecção.

O fósforo-32 (³²P) é o isótopo mais comumente usado para marcar radiativamente o ácido nucleico. Emite partículas energéticas β, tem alta atividade específica (9200 Bq) na forma pura e meia-vida curta (14 dias). O isótopo ³²P pode ser inserido na posição alfa (α) ou gama (γ) da molécula de trifosfato que se liga a um nucleosídeo (açúcar e base nitrogenada). Assim, podemos adquirir ribonucleotídeos (NTP) e desoxirribonucleotídeos (dNTP) marcados com fosfatos nas posições α ou γ (Fig. 3.1). A escolha da posição de marcação do fosfato depende de qual extremidade (3' ou 5') da molécula de ácido nucleico deve permanecer acessível para as reações posteriores. Moléculas com extremidade 3' livre normalmente são marcadas com nucleotídeos que contêm fosfato marcado na posição α, enquanto aquelas com extremidade 5' livre e desfosforilada são marcadas com nucleotídeos contendo fosfato marcado na posição γ.

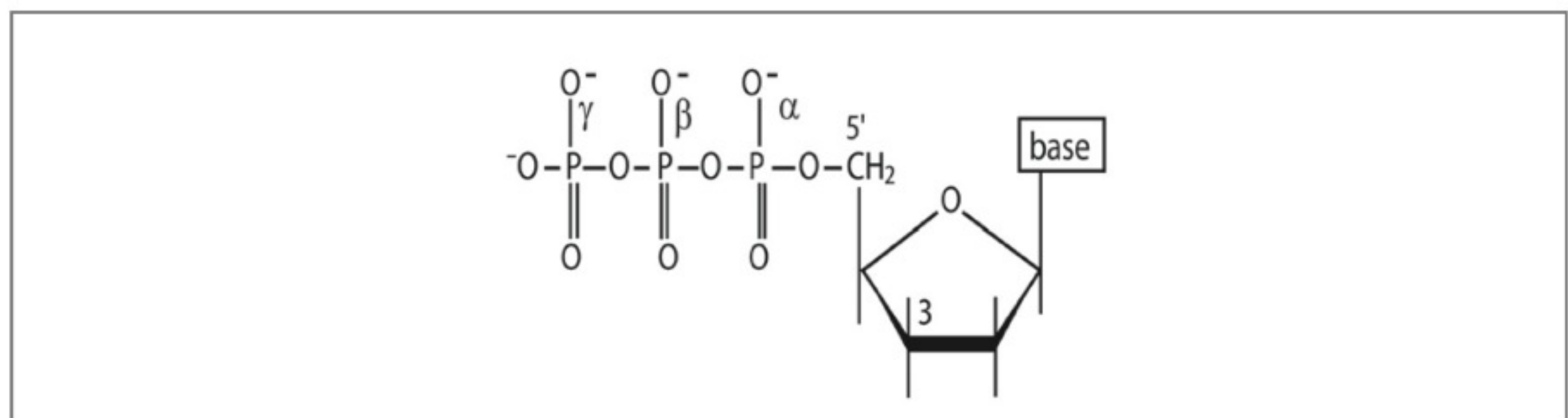


Figura 3.1 - Molécula de nucleotídeo trifosfato. As moléculas de fosfato estão nas posições alfa, beta e gama, tendo como referencial o carbono -5' da molécula de açúcar.

Precusores de NTP ou dNTP marcados com ^{32}P podem ser adquiridos com várias atividades específicas. Em geral, os precusores que contêm fosfato marcado na posição α (todos os NTP e dNTP) são fornecidos com atividades de 400 a 800 Bq. Os precusores com fosfato marcado na posição γ (adenosina ou guanosina-5'-trifosfato) são fornecidos com atividades de 3.000 a 7.000 Bq. O ^{33}P possui atividade específica de 1.850 Bq e atualmente vem sendo muito utilizado na marcação de cDNA, nos experimentos de macroarranjos (*macroarray*) de DNA, por gerar sinais mais definidos, uma vez que apresenta menor atividade específica que o ^{32}P .

O ^{35}S é menos energético (atividade específica de 1.500 Bq na forma pura) e meia-vida longa (87 dias). Os nucleosídeos trifosfatos marcados com ^{35}S têm um grupo tiol (SH) que substitui o oxigênio covalentemente ligado ao fosfato. Essa é uma alteração significativa que pode inibir muitas enzimas utilizadas em experimentos posteriores. Devido à baixa energia, o ^{35}S causa pouco dano ao ácido nucleico e é mais útil em preparações mais estáveis, porém produz sondas com menor especificidade. O ^{35}S pode substituir o ^{32}P nos procedimentos de sequenciamento de DNA com terminação dideoxi. Devido a sua baixa energia, produz imagens mais definidas na autorradiografia.

O ^3H apresenta atividade específica ainda menor (29Bq na forma pura) e meia-vida muito longa (12 anos). A emissão é muito fraca para a maioria dos procedimentos de autorradiografia, embora seja usada para hibridação *in situ*. O ^3H é usado principalmente para a análise quantitativa de síntese e degradação de ácidos nucleicos.

Nos procedimentos em que se utilizam isótopos, os usuários devem usar luvas e outros equipamentos de proteção individual (EPIs) adequados e seguir as práticas de proteção radiológica ocupacional e ambiental recomendadas [ver Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) – www.cnem.gov.br e Manual de Biossegurança, Hirata e Mansini, 2002]. Os procedimentos experimentais devem ser realizados em uma área específica, devidamente demarcada e identificada, e equipamentos, materiais, reagentes, ambientes e EPIs devem ser frequentemente monitorados para a detecção de contaminação provável. A exposição ao ^{35}S é menos prejudicial à saúde do que a exposição ao ^{32}P , porém o ^{35}S é mais difícil de detectar com um monitor de radiação-padrão.

Algumas desvantagens inerentes à marcação com isótopos, principalmente os ^{32}P e ^{33}P , incluem: baixa meia-vida do isótopo (aproximadamente 15 dias); po-

tencialidade para induzir danos à saúde; necessidade de materiais, recipientes, equipamentos e área física exclusiva para o manuseio e descarte correto e seguro de produtos e resíduos isotópicos; e alto custo. Além disso, o método apresenta baixa sensibilidade porque cada isótopo gera apenas um evento de sinal detectável por molécula, o que requer longo período de exposição para a obtenção do sinal (Dickson et al., 1995).

Dentre as moléculas sinalizadoras marcadas com isótopos, os nucleotídeos marcados com fósforo radioativo são os mais frequentemente usados. Sua introdução ao ácido nucleico pode ser realizada por meio de reações de marcação que incluem: preenchimento da extremidade 3' ou 5' (*fill in*); *nick translation*; inserção de oligonucleotídeos aleatórios (*random primers*); reação em cadeia de polimerase (PCR), empregando enzimas como DNA polimerase; DNA polimerase 1; fragmento Klenow; T4 DNA polimerase; endonuclease de restrição ou endonucleases; transferase terminal (deoxinucleotidiltransferase); T4 polinucleotídeo cinase; DNase I e RNA polimerase SP6, T3 e T7 (para mais detalhes ver Ausubel et al., 1990; Farrell, 1993 e Hilario, 2004).

Sistema de Detecção de Sondas Isotópicas

A autorradiografia é uma técnica fotoquímica sensível e simples usada para registrar a distribuição espacial de compostos radiomarcados dentro de um espécime ou um objeto. É subdivida em dois grupos, comumente referidos como microautorradiografia e macroautorradiografia. No primeiro caso, o resultado é alcançado cobrindo uma secção fina do espécime com uma emulsão sensível à luz. Essa técnica também é conhecida como autorradiografia *in situ* e usualmente realizada diretamente sobre uma lâmina de vidro com tecidos/células previamente fixados. Devido ao fato de essa técnica ter a vantagem de manter a geometria celular natural, a distribuição intracelular do radiomarcador pode ser facilmente determinada utilizando-se um microcópio óptico e eletrônico (por exemplo, contagem dos grânulos). Na macroautorradiografia, a membrana de filtro que contém os ácidos nucleicos marcados com o radioisótopo é protegida por um filme plástico e colocada em contato direto com um filme de radiografia. Esse procedimento é conhecido por exposição direta e utilizado nos ensaios de *Southern blotting*; *Northern blotting* e *macroarray*, por exemplo.

O filme radiográfico tem uma base de poliéster de 0,016 mm recoberta com uma emulsão que contém gelatina e sais de prata (AgBr ou AgCl) sensíveis a luz.

Durante a exposição do filme, a energia liberada pelo isótopo (radiação ionizante e fótons de luz) é absorvida pelos cristais de prata da emulsão gerando fotoelétrons. Os fotoelétrons migram pela matriz de cristal até atingir a superfície de captura de elétrons, onde reduzem os íons Ag^+ a prata metálica (Ag^0) que se deposita para formar a imagem latente (invisível) e que posteriormente é detectada pelo sistema de revelação radiográfica. A imagem final revelada pode ser avaliada por meio de densitometria realizada por *scanner a laser* ou da inspeção visual (resultados menos preciso).

A detecção autorradiográfica pode ser melhorada por meio do uso de **tela de intensificação** constituída de uma base de poliéster flexível recoberta com fósforo inorgânico. O tipo de tela mais comum é a de tungstato de cálcio (CaWO_4) recoberta com fósforo. O fósforo inorgânico converte a radiação ionizante em ultravioleta (luz azul), que exibe sinais de fundo muito baixos e são altamente compatíveis com os padrões de autorradiografia em uso. Recomenda-se que as telas de intensificação sejam mantidas no escuro por algumas horas ou durante a noite, antes do uso, para evitar alto sinal de fundo e consequentemente o escurecimento do filme. Outros tipos de telas de intensificação contêm terras raras, tais como oxibrometo de lantânio (luz azul) ou oxissulfeto de gadolínio (luz verde), e podem ser usadas para intensificar a captação de radiação ionizante pelos filmes radiográficos.

Outro método de detecção de radiação isotópica da membrana (náilon ou nitrocelulose) é a exposição à **placa de fosforoimagem** (*phosphorimaging*), matriz de tela

dopada com európio. Nesse sistema, os elétrons gerados pelo decaimento espontâneo do európio radiativo presente na amostra interagem com a placa de *fosforoi-magem*, formando uma imagem estável que corresponde precisamente à distribuição da intensidade da radiação de origem. A imagem é detectada por uma leitora de tela com laser vermelho que libera a energia estocada, a qual é proporcional à energia absorvida. A informação é armazenada em formato digitalizado por meio do uso de programa de análise de imagem (Zouboulis e Tayakkol, 1994).

Sistemas de Marcação Não Isotópica

Nos métodos não radiativos, um composto ou grupo químico normalmente não encontrado nos ácidos nucleicos é conjugado à sonda por reação enzimática, fotoquímica ou sintética. Após a hibridação da sonda ao ácido nucleico alvo, o sinal é detectado por sistemas indicadores apropriados (Quadro 3.2).

A marcação não isotópica tem a vantagem de fornecer maior rendimento de sonda marcada e a sonda é mais estável para múltiplos experimentos. O marcador pode ser ligado em diferentes locais da sonda, porém, para obter a hibridação específica entre a sonda marcada e o DNA/RNA-alvo, é importante que o procedimento de marcação não modifique substancialmente a estrutura da sonda (Fig. 3.2). Além disso, a molécula sinalizadora deve estar covalentemente ligada à sonda de forma a se manter estável nas etapas de desnaturação e hibridação.

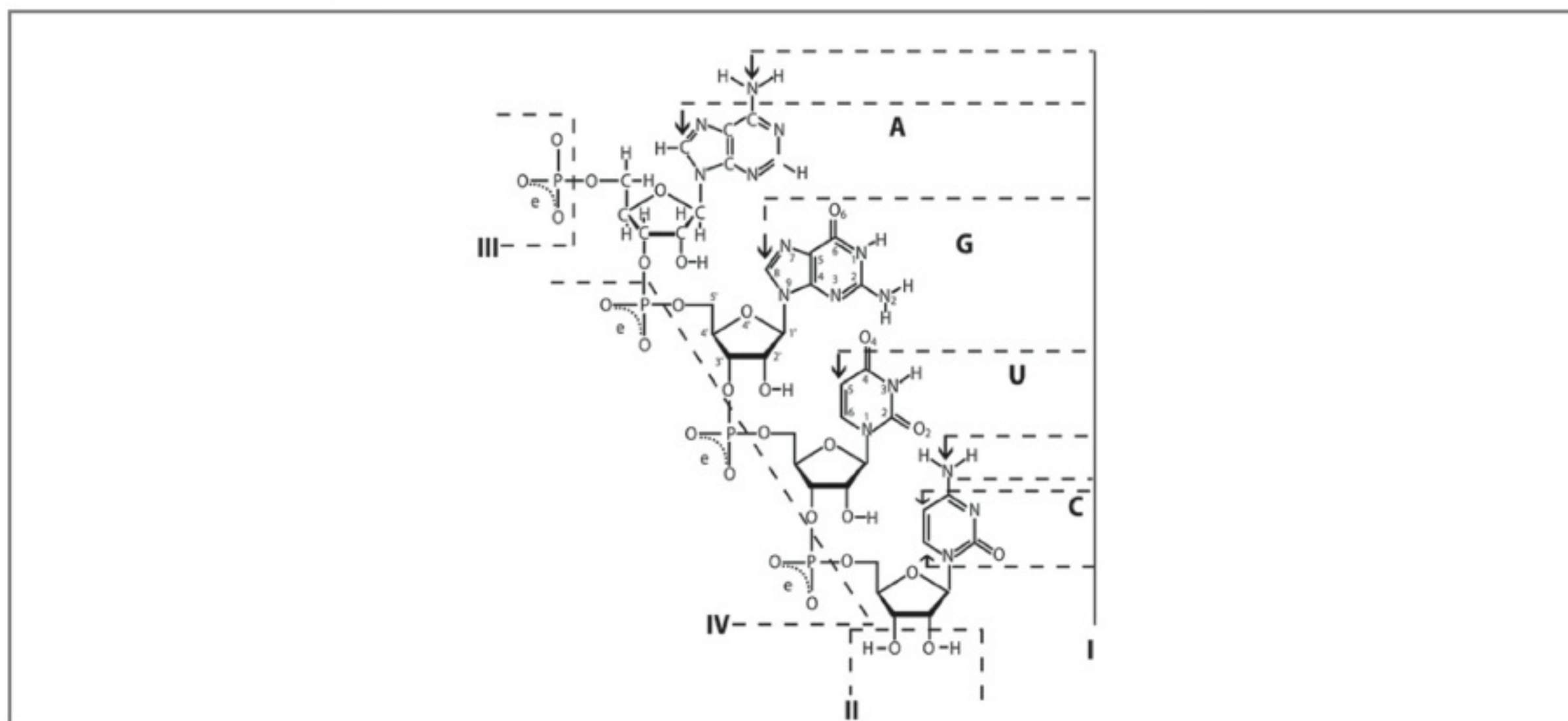


Figura 3.2 – Modelo simplificado da sonda de ácido nucleico apresentando os locais de inserção do marcador não isotópico. I– Nucleotídeos individuais. II– Extremidade 3' (RNA). III– Grupo fosfato terminal 5'. IV– Interações iônicas entre grupos fosfatos e, por exemplo, proteínas carregadas positivamente capazes de promover ligação cruzada a bases nitrogenadas. Modificado de Hopman et al., 1995.

Marcadores Não Isotópicos

As moléculas sinalizadoras utilizadas na marcação não isotópica de sondas nucleotídicas mais comuns incluem os nucleotídeos biotinilados, biotina fotoativável (PAB), digoxigenina (DIG), fluorocromos (fluoresceína, rodamina e cumarina), ou enzimas como a marcação quimioluminescente aumentada (*Enhanced Chemiluminescence labeling*). A inserção da molécula sinalizadora não isotópica ao ácido nucleico alvo, pode ser realizada utilizando procedimentos como os descritos no Marcadores isotópicos (para detalhamento desses procedimentos ver Farrell, 1993; Hughes et al., 1995; Sambrook e Russel, 2001; Hilario, 2004). A biotina e a digoxigenina podem ser ligadas ao ácido nucleico por meio de ligações fotoquímicas. Em ambos os casos, o marcador é ligado a um grupo nitrofenilazida que é convertido, por irradiação com luz ultravioleta ou visível forte, a um nitreno altamente reativo que pode formar ligações covalentes com DNA e RNA (Sambrook e Russel, 2001). A marcação fotoquímica é menos eficiente do que a enzimática (Sambrook e Russel, 2001).

Na biotinilação, é utilizada a vitamina hidrossolúvel **biotina**, que pode ser rapidamente conjugada a várias moléculas biológicas. A síntese de nucleotídeos biotinilados foi descrita inicialmente por Langer et al., (1981), que utilizaram análogos de 2'-deoxirribonucleotídeo trifosfato uridilato e de ribonucleotídeo trifosfato uridilato (dUTP e UTP) com uma molécula de biotina covalentemente ligada no carbono -5' do anel da pirimidina por meio de um braço espaçador (*linker*) de alilamina. A biotinilação interfere muito pouco com a atividade biológica devido à presença do *espaçador* que minimiza a interferência do éster entre a biotina e a molécula da sonda. As sondas biotiniladas permitem a detecção utilizando-se tanto sistemas cromogênicos como quimioluminescentes.

A **biotina** também pode ser usada em reações de marcação de fotoativação e nesse caso é empregado seu análogo fotorreativo sintético. Para tanto, a molécula de biotina é ligada à arilamida que pode ser fotoativada e gerar aril-nitrenos altamente reativos que se acoplam às bases aromáticas dos ácidos nucleicos. Essa técnica é útil para gerar fragmentos completos de sondas, estáveis sob uma variedade de condições tais como pH alcalino, temperaturas elevadas e irradiação.

A **cardenolídeo digoxigenina** (Mr = 390.53) pode ser derivado por remoção química ou enzimática de quatro resíduos de açúcar do desacetilanosídeo C isolado de *Digitalis purpurea* ou extraído diretamente de *D. orientalis* e *D. lanata* da família *Scrophulariaceae*. A digoxigenina pode ser acoplada ao UTP formando a di-

goxigenina-11-UTP ou o dUTP que origina a digoxigenina-11-dUTP. A marcação da sonda nucleotídica com digoxigenina pode ser realizada por ligação covalente mediada por grupos nitrenos altamente reativos presentes em moléculas espaçadoras utilizadas para acoplar a molécula de digoxigenina ao ácido nucleico da sonda.

Os **fluorocromos** são moléculas fluorescentes que podem ser utilizados na marcação de sondas nucleotídicas (para revisão ver Kricka, 2002). Os primeiros fluorocromos descritos foram os dideoxynucleotídeos modificados com fluoresceína empregados em reações de sequenciamento. Posteriormente, foram sintetizados dUTPs marcados com fluoresceína; rodamina e metil coumarina, sendo a marcação com fluoresceína a mais amplamente utilizada.

As **enzimas** também têm sido muito utilizadas para a marcação de sondas nucleotídicas. A marcação fundamenta-se na interação iônica de macromoléculas carregadas positivamente com os grupos fosfatos da sonda de ácido nucleico, seguindo-se uma ligação cruzada (*cross-linking*) com os resíduos das bases nitrogenadas. As enzimas peroxidase e fosfatase alcalina são exemplos usados para a marcação de sondas nucleotídicas. O acoplamento da enzima à sonda faz-se por meio da ligação covalente do glutaraldeído. Para facilitar essa ligação, uma pequena molécula polianiônica, como a polietilenoimina, é acoplada à enzima utilizando-se a *p*-benzoquinona. A estabilidade térmica dos híbridos formados entre a sonda marcada com enzima e o ácido nucleico-alvo é levemente reduzida como resultado do procedimento de modificação. A β -galactosidase é outra enzima empregada na detecção de ácidos nucleicos.

Detecção de Sondas Não Isotópicas

A detecção de sondas não isotópicas envolvem os sistemas colorimétricos, quimioluminescente e fluorescente, dependendo da molécula sinalizadora e/ou do substrato utilizado para gerar o sinal de identificação.

Detecção Colorimétrica

Nos ensaios que empregam substratos colorimétricos, o que se observa como resultado final é a presença de um produto insolúvel, o qual precipita no sítio de anelamento da sonda ou da formação do produto. Em termos de sensibilidade, são três a quatro vezes menos sensíveis que outros métodos de marcação não isotópicos. As moléculas de marcação mais utilizadas no sistema colorimétrico são as enzimas, especialmente a peroxidase de rabanete (*horseradish peroxidase* – HRP) e a fosfatase alcalina (ALP).

As principais vantagens dos ensaios colorimétricos estão relacionadas com a possibilidade de a análise ser visual e simples e um registro permanente pode ser gerado. Contudo, os precipitados são frequentemente difíceis de ser removidos da membrana, tornando a reutilização da membrana difícil ou impossível.

Dentre os substratos colorimétricos da peroxidase de rabanete, os mais empregados são: i) 3,3'-tetraidrocloroto de diaminobenzidina (DAB): o produto de oxidação do DAB sofre polimerização e forma um resíduo marrom intenso que é insolúvel em água e em etanol (cuidados devem ser tomados durante o seu manuseio devido ao potencial carcinogênico); e ii) 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB): o produto de oxidação do TMB é solúvel mas pode ser precipitado nos *blots* empregando-se o sulfato de dextrana ou pode ser utilizada a forma particulada do TMB disponível comercialmente. Outros substratos que podem ser utilizados são: diidrocloreto de o-fenilenodiamina (OPD) que produz um precipitado de cor laranja-tangerina; e o 2,2'-azino-di(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) que produz um precipitado de cor verde.

Para a detecção de sondas marcadas com fosfatase alcalina, os substratos mais utilizados são 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) e cloreto de 4-nitrozol de tetrazólio (NBT). O BCIP é usado em associação com o NBT (reagente binário) para formar um precipitado de cor azul-púrpura no sítio de atividade da fosfatase alcalina e é o sistema indicador mais disponível para a detecção cromogênica do conjugado com fosfatase alcalina. Outro substrato empregado para a detecção da ALP é *p*-nitrofenol fosfato (*p*-NPP).

Detecção Quimioluminescente

O sistema quimioluminescente baseia-se na geração de luz por reações químicas. Esse sistema apresenta as vantagens de alta sensibilidade e de vários métodos de análises, incluindo sistema manual ou automatizado de processamento da autorradiografia. Outra vantagem para os ensaios de *blots* por quimioluminescência é que geralmente as sondas não precisam ser removidas para re-hibridação.

A principal desvantagem da detecção quimioluminescente é a rápida cinética de decaimento do sinal e a resposta não linear do filme usado para detecção da emissão de luz. Fato este, que dificulta as análises quantitativas e a comparação de resultados entre testes. Em adição, o *background* resultante da hidrólise não enzimática do substrato quimioluminescente, reduz a sensibilidade.

Dentre os reagentes empregados nos sistemas de detecção por quimioluminescência, temos: i) luminol: empregado em associação com a peroxidase; e ii) fosfato de adamantil-1,2-dioxetano, também conhecido como 3-[2' espiroadamantana]-4-metoxi-4-[3''-(fosforiloxi)fenil]-1,2-dioxetano ou 3-(4-metoxispiro[1,2-dioxetane-3,2''-tricyclo-]3.3.1.1^{3,7}) [decan]-4-yl)-fenilfosfato dissódico (AMPPD), que é um substrato da fosfatase alcalina (ALP). A sensibilidade de detecção é superior a do método colorimétrico, de bioluminescência ou fluorimetria e é equivalente a da técnica autorradiográfica. O sinal emitido pelo produto gerado por 1000 ou mais moléculas de ALP pode ser detectado. É possível detectar quantidades de 0,1 pg ou superiores de RNA ou DNA em sistemas de hibridação como *Northern* ou *Southern blotting* utilizando-se o sistema de detecção com ALP.

Detecção Fluorescente

A fluorescência é um tipo específico de luminescência, denominado de luz absorviva (excitação de um elétron a partir de um estado de repouso para um estado excitado) seguido de uma rápida emissão de luz proveniente do estado excitado (geralmente, porém não necessariamente igual ao estado absorvivo) para o estado de repouso. Na fluorescência, um único foton de luz é absorvido por uma molécula que atinge o estado excitado e é re-emitido a uma energia relativamente baixa (comprimento de onda longo).

Em relação aos ensaios heterogêneos ou separação que empregam suportes sólidos como as membranas de nylon, os produtos fluorescentes de sondas marcadas com enzimas podem ser detectados por telas de intensificação como descrito para os sistemas de detecção isotópica. Filmes fotográficos instantâneos e de autorradiografia também podem ser usados para a detecção qualitativa e semiquantitativa da emissão de luz, bem como luminômetros. A ALP, por exemplo, catalisa a conversão da forma fosfato do substrato de AttoPhos® (JBL Sientific) para BBT, cuja fluorescência pode ser detectada por uma tela de intensificação.

O substrato da ALP utilizado nesse sistema é o 2-hidroxi-3-ácido naftoico 2'-fenilnilida fosfato (HNPP) que após sofrer desfosforilação gera um produto insolúvel fluorescente. Esse precipitado se deposita sob a membrana e pode ser excitado por irradiação a 290 nm em transiluminador. A energia emitida a 509 nm pode ser capturada por um câmara com dispositivo associado à carga (CCD) ou por um filme fotográfico.

Sistemas de Detecção de Sondas Não Isotópicas

Sistema de Detecção Direta

No sistema de detecção direta, a molécula sinalizadora está acoplada diretamente na sequência de nucleotídeos (sonda) (Fig. 3.3) e é revelada por meio de reações colorimétricas, quimioluminescentes e fluorescentes, dependendo do substrato empregado. Exemplos de algumas moléculas sinalizadoras empregadas: fluoresceína, vermelho-texas ou rodamina, éster de acridínio ou enzimas. Na figura 3.3, temos esquematizado a marcação direta da sonda nucleotídica pela enzima fosfatase alcalina.

Sistema de Detecção Indireta

Nos sistemas de detecção indireta, a sonda é marcada com uma molécula intermediária, que na sequên-

cia interage com uma enzima, por exemplo, e que, por sua vez, atua sobre a molécula de detecção que pode ser substrato cromogênico, quimioluminescente e fluorescente.

Uma das moléculas intermediárias mais comuns para a marcação de sondas é a digoxigenina, que pode ser reconhecida por um anticorpo específico, o qual é ligado covalentemente a uma enzima de detecção (fosfatase alcalina ou peroxidase), anteriormente comentada. Na figura 3.4, é mostrado um esquema de utilização de digoxigenina como molécula sinalizadora.

Outro sistema de detecção indireta é a biotina-avidina ou biotina-estreptavidina. A estreptavidina é uma proteína tetramérica, isolada da bactéria *Streptomyces avidinii*, e possui quatro sítios de ligação com a biotina. A estreptavidina tem alta afinidade pela biotina ($kD = 10^{-15}M^{-1}$), ponto isoelétrico neutro em pH fisiológico e

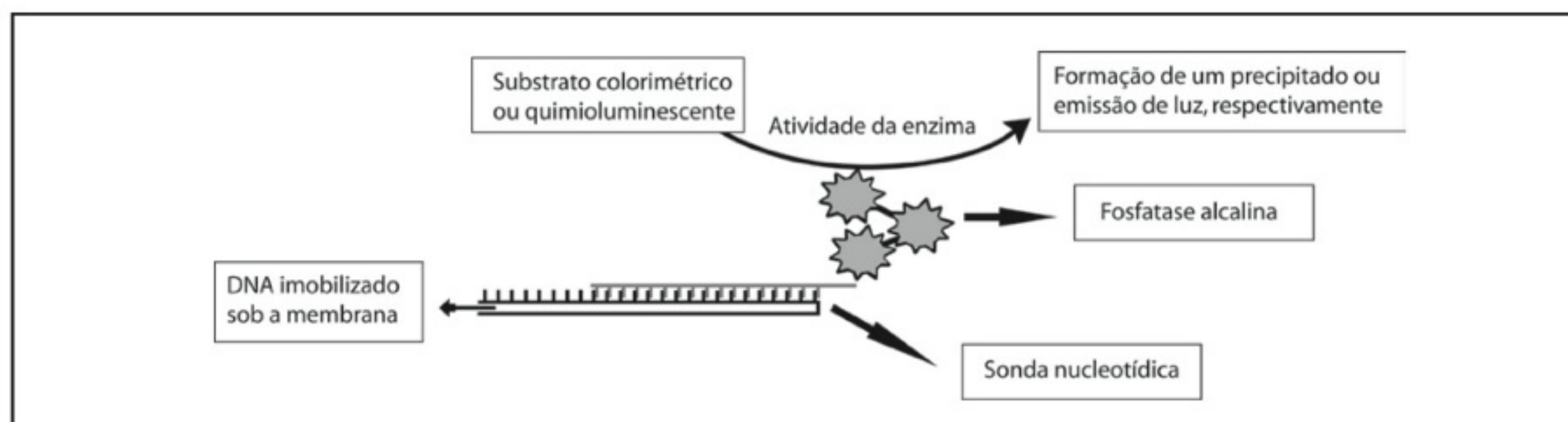


Figura 3.3 – Representação esquemática da marcação direta utilizando a enzima fosfatase alcalina. A sonda nucleotídica encontra-se ligada à enzima fosfatase alcalina, que ao interagir com um substrato colorimétrico ou quimioluminescente pode gerar um precipitado ou a emissão de luz, respectivamente.

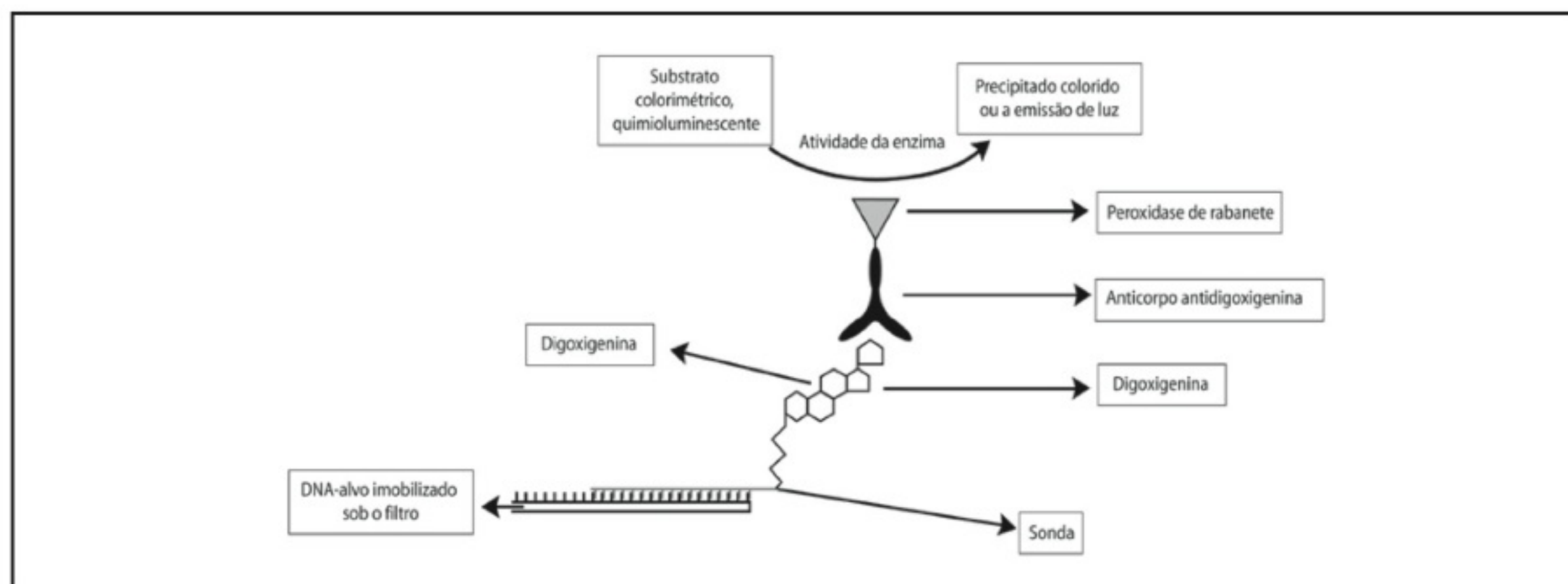


Figura 3.4 – Esquema representativo de sistema de detecção indireta, utilizando a digoxigenina. A sonda de nucleotídeo está marcada com digoxigenina que, por sua vez, é reconhecida pelo anticorpo antidigoxigenina conjugado com a peroxidase de rabanete ou fosfatase alcalina. Este complexo pode ser detectado por meio da ação da enzima sob um substrato colorimétrico ou quimioluminescente.

poucos grupos carregados, e não contém carboidratos. Essas propriedades reduzem a probabilidade de ligações inespecíficas e o sinal de fundo (*background*).

Na figura 3.5, observa-se o sistema de detecção indireta utilizando a biotina como molécula sinalizadora. Nesse exemplo, a sonda é marcada com biotina, e a

enzima conjugada com a estreptavidina, a qual interage com uma enzima (peroxidase de rabanete ou fosfatase alcalina) que, por sua vez, atua sobre o substrato de detecção (colorimétrico e/ou quimioluminescente).

Na figura 3.6, podemos observar um esquema geral de um sistema heterogêneo (com etapa de separação) para

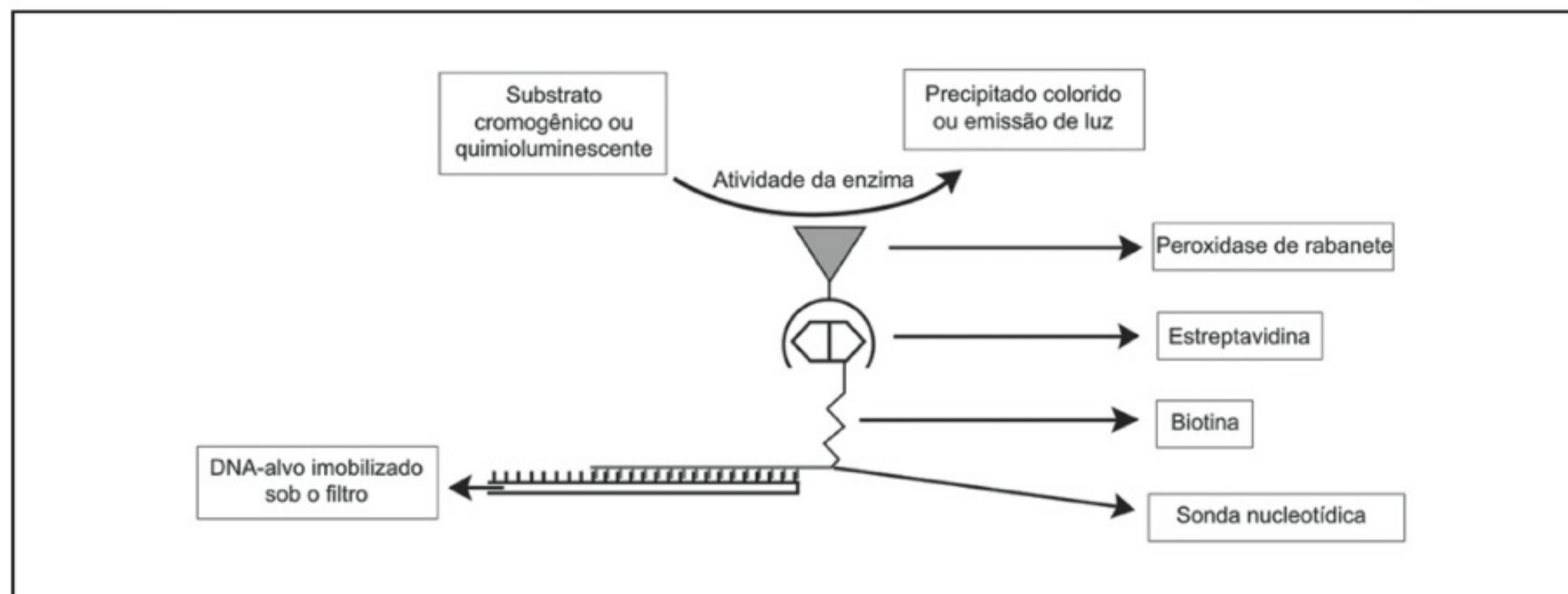


Figura 3.5 – Esquema representativo de sistema de marcação indireta, utilizando a biotina. A sonda nucleotídica está marcada com a biotina, reconhecida pela estreptavidina conjugada com a peroxidase de rabanete, que pode agir sobre um substrato colorimétrico ou quimioluminescente, gerando um precipitado colorido ou emitindo luz, respectivamente.

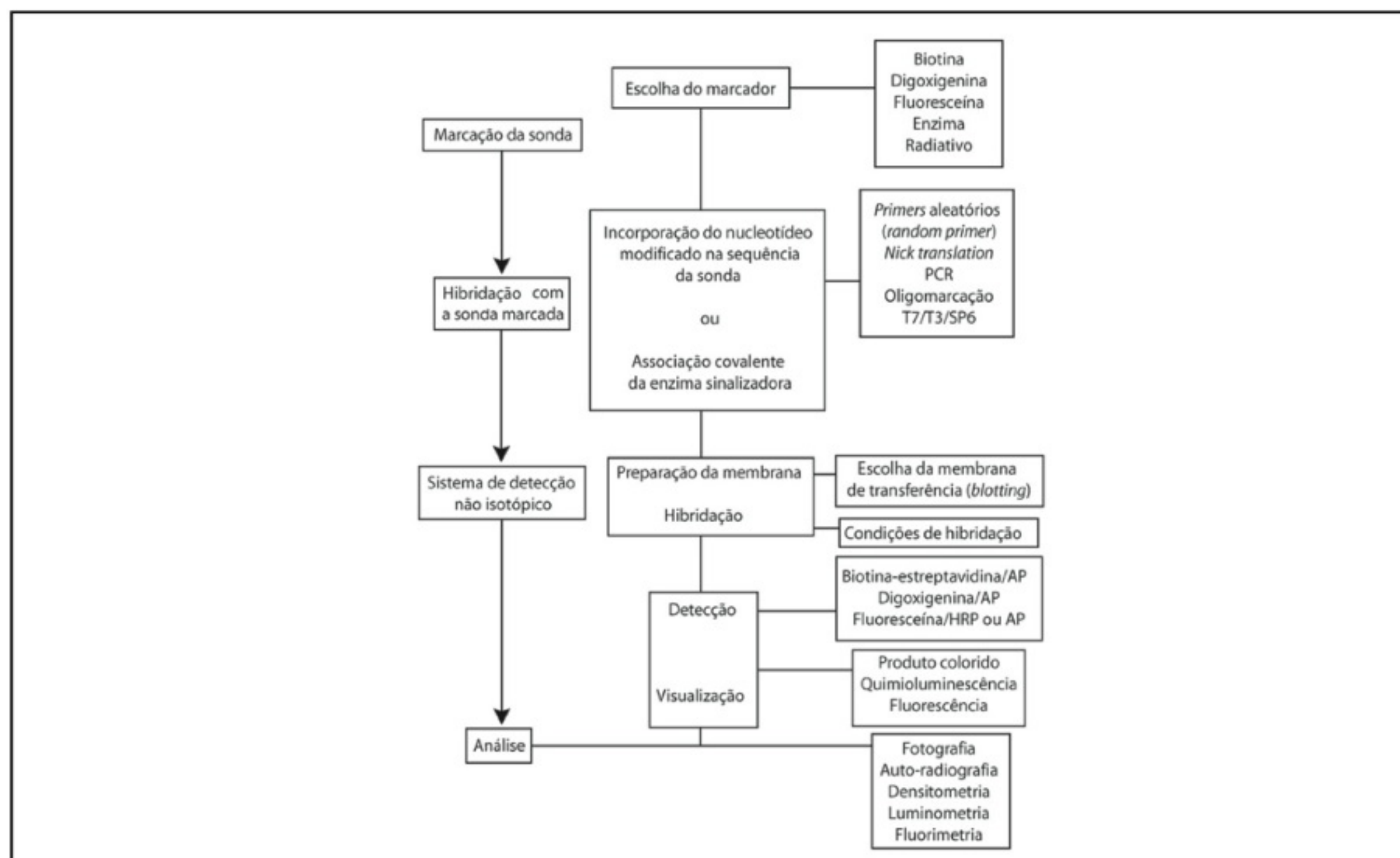


Figura 3.6 – Fluxograma geral do processo de identificação de ácido nucleico por meio do sistema heterogêneo ou separação, utilizando sondas marcadas com moléculas sinalizadoras radiativas ou não radiativas. Ver os capítulos 6, 7, 15 e 23 para informações relativas a transferência para membranas (*blotting*) e as condições de hibridação. Adaptado de Hughes et al., 1995.

a detecção de ácidos nucleicos utilizando-se marcação isotópica e não isotópica de sondas nucleotídicas.

Referências

- Arrand, J.E. Preparation of nucleic acid probes. In: Hames, B.D.; Higgins, S.J., eds. *Nucleic Acid Hybridisation a Practical Approach*. IRL Press Oxford, Cap.2, 1988.
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. Enzyme for modifying and radioactively labeling nucleic acids. In: Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. p. 3.4.1., Section III, supplement 9, 1990.
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. Radiosotopes for labeling nucleic acids. In: Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. eds. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. p. 3.4.7., supplement 35, volume 2, 1992.
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. Labeling and colorimetric detection of nonisotopic probes. In: Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. eds. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. p. 3.18.1., Section V. supplement 20, volume 2, 1992.
- Colli, C.; Mesquita, C.H. Biossegurança no uso de radioisótopos. In: Hirata, M.H.; Filho, M. J. eds. *Manual de Biossegurança*. São Paulo, Manole, Cap. 8, 2002, p. 201-231.
- Comissão Nacional de Energia Nuclear. <<http://www.Cnen.gov.br>>.
- Davis, L.G.; Kuehl, W.M.; Battey, J.F. Overview of methods for labelling oligo- and polynucleotides. In: Davis, L.G.; Kuehl, W.M.; Battey, J.F. ed. *Molecular Biology*. Section 6-1, 1986, p. 190.
- Dickson, E.F.G.; Pollak, A.; Diamandis, E.P. Ultrasensitive bioanalytical assays using time-resolved fluorescence detection. *Pharmac. Ther.*, 66: 207-235, 1995.
- Farrell, R.E., Jr. Nucleic acid probe technology In: Farrell R.E. Jr. ed. *RNA Methodologies – Laboratory Guide for Isolation and Characterization*. San Diego, CA: Academic Press, Cap. 10, 1993.
- Farrell, R.E., Jr. Principles of Detection. In: Farrell R.E. Jr. ed. *RNA Methodologies – Laboratory Guide for isolation and Characterization*. San Diego, CA, Academic Press, Cap. 12, 1993.
- Ha, T. Single-molecule fluorescence methods for the study of nucleic acids. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 11(3): 287-292, 2001.
- Hilario, E. End labeling procedures an overview. *Methods Mol. Biol.*, 179: 13-18, 2002.
- Hilario, E. End labeling procedures an overview. *Mol. Biotechnol.*, 28(1): 77-80, 2004.
- Hopman, A.H.N.; Speel, E.J.M.; Vooerter, C.E.M.; Ramaekers, F.C.S. Probe labeling methods. In: Levy, E.R. e Herrington, C.S., ed. *Non-Isotopic Methods in Molecular Biology. A Practical Approach*. IRL PRESS. Oxford University Press, Cap. 1, 1995. p. 1-24.
- Huang, Z.; Szostak, J.W. Selective labeling and detection of specific RNAs in an RNA mixture. *Analyt. Biochem.*, 315:129-133, 2003.
- Hughes, J.R.; Evans, M.F.; Levy, E.R. Non-isotopic detection of nucleic acids on membranes. In: Levy E.R.; Herrington, C.S. ed. *Non-Isotopic Methods in Molecular Biology. A Practical Approach*. IRL PRESS. Oxford University Press, Cap. 6, 1995, p. 145-182.
- Kricka, L.J. Nucleic acid detection technologies – labels strategies, and formats. *Clin. Chem.*, 45(4): 453-458, 1999.
- Kricka, L.J. Stains, labels and detection strategies for nucleic acids assays. *Ann. Clin. Biochem.*, 39(Pt 2): 114-129, 2002.
- Mansfield, E.S.; Worley, J.M.; McKenzie, S.E.; Surrey, S.; Rappaport, E.; Fortina, P. Nucleic acid detection using non-radioactive labelling methods. *Mol. Cell. Probes*, 9: 145-156, 1995.
- Sambrook, J.; Russell, D.W. Autoradiograph and imaging. In: Sambrook, J.; Russell, D.W. eds. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, Appendix 9, 3th ed., 2001.
- Sambrook, J.; Russell, D.W. Preparation of radiolabeled DNA and RNA probes. In: Sambrook, J.; Russell, D.W. eds. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, Cap. 9, 3th ed., 2001.
- Sambrook, J.; Russell, D.W. Preparation of cDNA libraries and gene identification, In: Sambrook, J.; Russell, D.W. eds. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, Cap. 11, 3th ed., 2001.
- Santos, R. Princípios básicos de Proteção Radiológica na utilização de Materiais Radioativos em Laboratórios. In: Texeira, P.; Valle, S. eds. *Biossegurança. uma abordagem Multidisciplinares*. Rio de Janeiro. Fundação Oswaldo Cruz, 1998; Cap. 11 p. 209.
- Zouboulis, C.C.; Tayakkol, A. Storage phosphor imaging technique improves the accuracy of RNA quantitation using ³²P-labeled cDNA probes. *Biotechniques*, 16(2): 290-292, 294, 1994.

4. Extração de Ácidos Nucleicos em Amostras Biológicas: Reagentes e suas Aplicações

Renata Gorjão
Rozangela Verlengia
Cristóvão Alves da Costa
Rui Curi

Introdução

A obtenção de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) a partir de células ou tecidos exige tratamentos específicos. Muitos protocolos têm sido descritos focando principalmente a necessidade da obtenção de um produto final altamente purificado. Entretanto, estes protocolos apresentam algumas diferenças em relação aos reagentes empregados, tempo de execução do experimento e quantidade de ácido nucleico obtido.

Contudo, em todos os protocolos descritos, com exceção da detecção de ácido nucleico direto de fluidos biológicos, as metodologias utilizadas são formadas por três etapas:

- (a) Lise das células
- (b) Purificação da amostra (remoção de proteínas contaminantes e outras macromoléculas)
- (c) Precipitação do ácido nucleico

Reagentes de Lise Celular

A lise celular é caracterizada pelo rompimento da membrana celular através do uso de várias substâncias e métodos físicos, que variam conforme o protocolo seguido. Geralmente, utilizam-se detergentes com ou sem aquecimento, congelamento e descongelamento, sonicação, homogeneização, agentes caotrópicos (ex.: isoticianato de guanidina ou iodeto de sódio), enzimas (ex.: proteinase K, lisozima), substâncias como saponina, que lisam eritrócitos e leucócitos ou hidróxido de sódio com aquecimento e tratamento com ácido perclórico. Muitas vezes é necessária a associação dos reagentes, para uma melhor lise da célula. A seguir, estão descritos alguns dos reagentes e métodos empregados na lise celular.

Detergentes

Os detergentes são agentes que rompem associações hidrofóbicas e destroem a bicamada lipídica da membrana celular. São moléculas anfipáticas que formam micelas em água. Quando em contato com a membrana celular, as extremidades hidrofóbicas dos detergentes ligam-se às porções hidrofóbicas das proteínas da membrana, desfazendo a bicamada lipídica. Como a outra extremidade do detergente é polar, ele forma complexos detergentes-proteínas, assim como as micelas solúveis de lipídio-detergente, visto que os fosfolipídios também são solubilizados pelo detergente.

Dentre os detergentes mais utilizados temos: sulfato de sódio dodecila (SDS) e o Triton X-100 empregados para a lise de eritrócitos, leucócitos e outros tipos de células eucarióticas e, a saponina para a liberação dos ácidos nucleicos de fungos, bactérias e protozoários.

Sulfato de Sódio Dodecila - SDS

O SDS é um detergente iônico (Fig. 4.1), ou seja, possui as extremidades hidrofílicas carregadas que além de ligar-se fortemente às porções hidrofóbicas da proteína, é um fraco inibidor de RNAses, sendo importante para evitar a presença de agentes contaminantes, tal como a enzima RNase na estocagem de amostras de RNA.

*Triton X-100 (Polioxi-etileno [7-8] *p*-*t* octil fenol)*

O triton X-100 (Fig. 4.1) é um detergente mais fraco utilizado para manter sistemas proteicos da membrana funcionalmente ativos, sendo bastante aplicado, portanto, em experimentos que consistem na análise da atividade dessas proteínas. Além disso, o Triton X-100 atua como agente dispersante de lipídios.

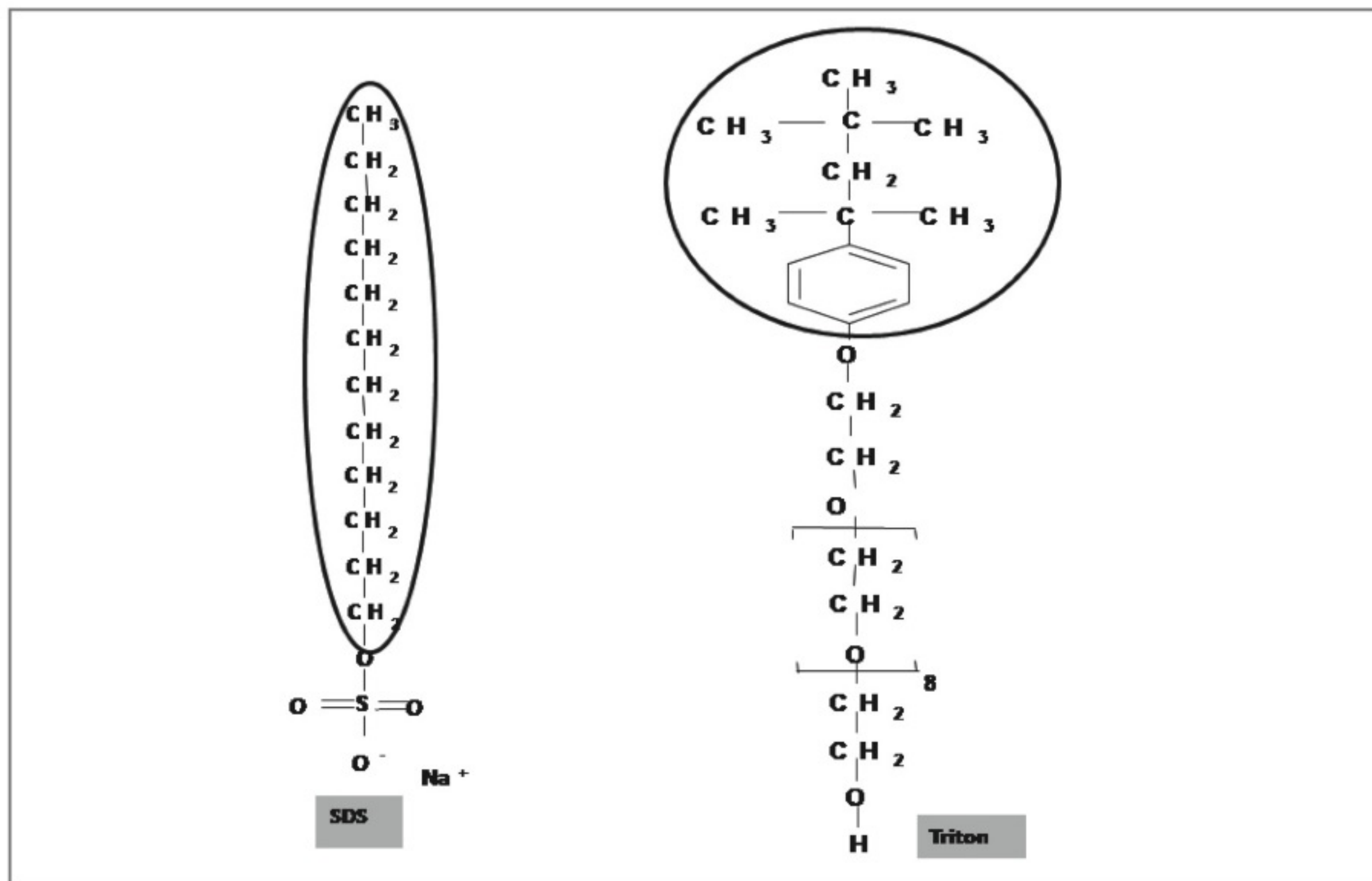


Figura 4.1 – Estrutura química do Sulfato de Sódio Dodecila (SDS) e Triton X-100. O SDS é um detergente aniônico constituído de uma parte hidrofóbica (circulada) e uma parte hidrofílica. O Triton X-100 é um detergente não iônico, constituído de uma parte hidrofóbica (circulada) e uma hidrofílica.

Sulfato de Sódio Laurico

Os organismos prontamente lisados por esse detergente incluem todas as linhagens de bactérias gram-negativas e os eucariotos *Dictyostelium discoideum*. Algumas linhagens de estreptococos são lisadas levemente com esse detergente, e a ruptura das células algumas vezes é facilitada aumentando-se a temperatura da mistura do lisado entre 70° e 75°C.

Saponina

A saponina é um detergente não iônico que age como desestabilizador de membrana, favorecendo a formação de coloides. Este reagente é comumente utilizado na lise de células mamárias.

Métodos Físicos de Lise Celular

Nos métodos físicos as células são submetidas a um choque mecânico promovendo a lise celular. Isto pode ocorrer por congelamento e descongelamento, sonicação e homogeneização.

Congelamento e Descongelamento

Durante o processo de congelamento ocorre a formação de cristais de gelo, nos quais as moléculas de água são fortemente ligadas umas às outras, enfraquecendo as ligações de pontes de hidrogênio e forças de van der Waals entre os lipídeos e proteínas. Portanto estes cristais promovem o rompimento celular. Quando as células são congeladas e descongeladas rapidamente na membrana ocorre a formação de grandes cristais de gelo que promovem o rompimento das células possibilitando a extração do conteúdo intracelular.

Sonicação

O sonicador rompe o tecido ou as células através de vibrações produzidas por ondas sonoras, frequentemente o ultrassom, que causam a quebra mecânica da parede celular. Normalmente, esse método é empregado para a obtenção de ácido nucleico e proteínas de amostras de bactérias e tecidos rígidos.

Homogeneizador

A homogeneização é a forma mais comum de romper tecido mole. A homogeneização é realizada através da trituração do tecido (Bollag e cols., 1996) ou forçando este a atravessar uma abertura estreita entre um pilão (*pestle*) de teflon e um recipiente de vidro ou uma tela (Bollag et al., 1996). Esses métodos são comumente empregados para a extração de ácido nucleico de tecidos de mamíferos tais como: fígado, tecido mamário e rim.

Agentes Caotrópicos

Os agentes caotrópicos, como tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidina e iodeto de sódio promovem um efeito que resulta na ligação proteína-surfactante entropicamente favorecida, como oposição à associação interproteína, conhecido como efeito caotrópico.

Esses sais afetam a estabilidade da proteína por duas formas diferentes. Em baixas concentrações, os íons interagem com proteínas via interações eletrostáticas inespecíficas. Essa neutralização eletrostática da carga da proteína, em geral, leva à estabilização de sua estrutura. No entanto, em altas concentrações (> 1M), sais apresentam efeitos íon-específicos que influenciam a estabilidade estrutural de proteínas. Sais como Na_2SO_4 e NaF, aumentam, enquanto NaSCN e NaClO_4 enfraquecem. A estrutura da proteína é influenciada mais por ânions do que por cátions. A capacidade relativa de vários ânions de poder isoônico em influenciar a estabilidade estrutural de proteínas e DNA, em geral segue a série:



Esta sequência de compostos é conhecida como Série de Hofmeister ou Série Caotrópica. Sais de fluoreto, cloreto e sulfato são estruturas estabilizadoras e sais de outros ânions desestabilizadoras.

Sais que estabilizam proteínas aumentam a hidratação e ligam-se fracamente, enquanto desestabilizadores têm efeito inverso. Em outras palavras, a desnaturação através do efeito caotrópico está relacionada à desestabilização das interações hidrofóbicas em proteínas.

Altas concentrações de compostos que tendem a quebrar pontes de hidrogênio, como ureia e sais de guanidina, também causam desnaturação de proteínas. Essas substâncias aparentemente causam a disrupção de pontes de hidrogênio que caracterizam a estrutura de cada proteína, promovendo a solubilidade dos resíduos hidrofóbicos em soluções aquosas.

O isotiocianato de guanidina é um forte inibidor de ribonucleases, sendo o método de purificação de RNA mais utilizado, substituindo a extração por fenol. Esse método de extração produz grandes quantidades de RNA puro e não degradado.

Em ácidos nucleicos de dupla fita, esses agentes caotrópicos quebram ligações de hidrogênio ou reduzem as interações hidrofóbicas entre as bases, diminuindo a temperatura de *melting*.

Enzimas

Várias enzimas são empregadas na extração de ácido nucleico, entre elas a lisozima e a proteinase K.

Lisozima

A lisozima é uma enzima que destrói as paredes de células bacterianas ao hidrolisar as ligações glicosídicas β (1→4) entre o ácido N-acetilmurâmico (NAM) e N-acetilglicosamina (NAG), dos peptidoglicanos da parede celular. Essa enzima hidrolisa também ligações β (1→4) de poli(NAG) um componente da parede celular da maioria dos fungos. A lisozima pode lisar bactérias gram-positivas, mas o pré-tratamento com um detergente é necessário para remover a membrana externa de bactérias gram-negativas. É comumente empregada em métodos que visam à obtenção de ácido nucleico de fungos e leveduras, os quais possuem parede celular compacta dificultando o rompimento, bem como para bactérias, embora essa apresente parede celular menos compacta. Os organismos lisados com lisozima incluem: *B. subtilis*, *B. natto*, *B. cereus*, *B. negatirium*, *Cl. perfringens*, bem como *Actinomyces* (*S. albus* e *S. viridochromagenes*), porém de forma menos eficiente (Grossowicz e Ariel, 1983).

Proteinase K

Proteinase K é uma protease serina altamente ativa do tipo subtilisina, que é secretada por meio de culturas estacionárias do fungo *Tritirachium album* var. Limber. A letra K no nome indica que a protease pode suprimir o requerimento total do fungo para carbono e nitrogênio pela hidrólise da queratina. A proteinase K catalisa a hidrólise de uma ampla variedade de ligações peptídicas, porém exibe uma preferência para ligações peptídicas carboxil-terminal presente em aminoácidos aromáticos ou não carregados.

A enzima possui 279 resíduos de aminoácidos ($M_r = 28,930$) e apresenta dois sítios de ligação para o cálcio, os quais não fazem parte do sítio catalítico, porém

contribui para a estabilidade estrutural da enzima. Quando o cálcio é removido, parte da atividade catalítica é perdida devido a alterações na estrutura que ocorrem ao longo da enzima.

A proteinase K permanece ativa na presença de ureia (1-4M) e detergentes, por exemplo. SDS a 0,5% ou triton X-100 à 1%, que são rotineiramente usados para lisar células de mamíferos. Pelo fato de a proteinase K digerir eficientemente proteínas nativas, pode inativar DNases e RNases em lisados de células, o que facilita o isolamento de DNA com alto peso molecular e RNA intacto.

Nucleases

São enzimas que degradam ácidos nucleicos. São inibidas por agentes quelantes como o EDTA, que sequestram íons metálicos bivalentes que as enzimas necessitam para poder atuar. Dentre as nucleases, a RNase e a DNase são as mais empregadas na obtenção de moléculas RNA ou DNA, respectivamente.

RNase

A RNase é normalmente empregada nos protocolos de extração de plasmídeo, atua hidrolizando o RNA. A RNase têm dois resíduos de histidina (His) que agem como catalizadores ácidos e básicos gerais (His 12 e His 119). A enzima atua em duas etapas:

- His 12 funciona como uma base que retira um próton do grupo 2' - OH do RNA, ocorrendo consecutivamente um ataque nucleofílico ao átomo de fósforo adjacente.
- His 119 age como um ácido doando um próton e favorecendo a quebra da ligação.
- Um intermediário 2' - 3' - cíclico é hidrolisado e novamente His 12 atua como uma base, e His 119, como um ácido.

Embora essa enzima seja de interesse na Biologia Molecular devido a sua elevada atividade, estabilidade e por estar presente em grande quantidade em matéria orgânica, é necessária uma série de cuidados visando inativar ou destruir a mesma em laboratórios que manipulam ácido nucleico, principalmente RNA (Fig. 4.2).

DNase I

Purificada de pâncreas bovino, a DNase I é uma nuclease que degrada a fita dupla de DNA agindo como uma exonuclease (uma enzima que cliva a ponte fosfodiéster em uma sequência polinucleotídica). Amostras de RNA que posteriormente serão utilizadas para a síntese de cDNA são tratadas com essa en-

zima para que resíduos de DNA sejam removidos da amostra e, portanto, não interfiram na amplificação de sequências de nucleotídeos por PCR (reação em cadeia pela polimerase).

EDTA

(Ácido Etilenodiaminotetracético)

Devido a sua ação quelante, o EDTA normalmente encontra-se associado aos métodos de obtenção de ácidos nucleicos removendo a presença de íons metálicos (Mg^{+2} , Ca^{+2}), principalmente aqueles utilizados por enzimas que possam degradar o ácido nucleico, tal como as DNases.

O cloreto de magnésio ($MgCl_2$) também pode ser empregado, contudo estudos sobre o efeito deste sal e do EDTA na extração de DNA mostraram que altas concentrações de $MgCl_2$ provocam a degradação do DNA. Mas quando o EDTA foi empregado este efeito diminui. Isto mostra que o EDTA é um forte quelante de íons magnésio exercendo importante proteção à molécula de DNA (Lahiri e Schnabel, 1983).

O EDTA também promove uma ação direta sobre a parede das bactérias gram-negativas. Nessas circunstâncias, elas são inicialmente tratadas com o EDTA que enfraquece as ligações iônicas da membrana externa, e assim produzem lesões, favorecendo o acesso à camada de peptidoglicano pela lisozima.

Glicose

Em alguns protocolos de obtenção de ácido nucleico provenientes de bactérias a glicose é utilizada no processo de lise celular. Este procedimento é frequentemente utilizado no protocolo padrão de minipreparação para obtenção de plasmídeos presentes em bactérias.

Através da diferença do aumento da permeabilidade da membrana promovido pelo EDTA ocorre entrada de glicose e na sequência as moléculas de açúcar do meio externo movem-se rapidamente para dentro, promovendo o inchaço celular. Este processo auxilia o rompimento celular (lise osmótica) permitindo portanto, a extração do ácido nucleico.

Agentes Ácidos e Básicos

As reações que ocorrem durante a hidrólise ácida de proteínas são muito complexas. Elas são influenciadas pela natureza e composição das proteínas, pela presença de impurezas e por oxigênio.

O ácido perclórico tem sido empregado na obtenção de amostras de ácido nucleico de vegetais. Devido à extrema diminuição do pH que ocorre com a adição de ácido perclórico, algumas proteínas desnaturam e precipitam (Volkin e Cohn, 1983).

O método de alcalinização é muito utilizado na extração de proteínas de bactérias gram-negativas. Além disso, o pH elevado pode inativar algumas proteases e alguns microrganismos de grande importância na engenharia genética. O NaOH rompe as pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas, promovendo a linearização e separação das fitas de DNA.

Deve-se tomar cuidado com a alcalinização da solução se o objetivo for a extração de RNA, visto que esse é altamente suscetível à hidrólise catalisada por base (Fig. 4.3). A desprotonização do grupo 2'-OH provocada pela base facilita o ataque nucleofílico ao átomo de fósforo adjacente, quebrando a estrutura da molécula de RNA. O nucleotídeo 2',3'-cíclico resultante é hidrolisado, formando dois compostos: 2'-nucleotídeo e 3'-nucleotídeo. Como a molécula de DNA não possui o grupo 2'-OH, ela apresenta maior estabilidade diante das soluções alcalinas.

Deve-se tomar cuidado com a utilização de reagentes ácidos ou alcalinos, pois condições extremas de pH podem levar à desnaturação das moléculas de DNA e RNA.

Purificação da Amostra

Após a lise celular e liberação do ácido nucleico, o passo seguinte consiste em isolar o ácido nucleico dos resíduos celulares e das proteínas. Nessa etapa, emprega-se

uma série de reagentes que visam precipitar as proteínas e os restos celulares. Dentre os reagentes empregados estão, solventes orgânicos (fenol e clorofórmio), e sais (cloreto de sódio, acetato de sódio e cloreto de amônio).

Solventes Orgânicos

Fenol

O método mais comumente usado para desproteínizar o DNA é a extração com fenol, o qual desnatura proteínas eficientemente e, provavelmente, dissolve a proteína desnaturada. Os produtos de oxidação do fenol podem danificar os ácidos nucleicos e somente fenol redistilado deve ser usado para a completa desproteínização. A extração pode ser repetida até que precipitados sem proteínas se encontrem na interfase aquosa/orgânica. Na figura 4.4 segue um esquema da desnaturação de proteínas por solvente orgânico.

Clorofórmio e Álcool Isoamílico

A purificação com fenol é seguida de extração com fenol/clorofórmio. Essa mistura reduz a quantidade de solução aquosa retida na fase orgânica (comparando com a fase de fenol puro), aumentando o rendimento do produto final, visto que a quantidade de ácido nucleico retido na fase orgânica será menor, pois ele está dissolvido na fase aquosa.

Na extração com fenol, se o pH da solução for 4,0, o RNA permanece na fase aquosa, enquanto o DNA fica retido na fase orgânica. Se o objetivo é a extração do DNA, o pH deve ser igual ou superior a 8,0, para ga-

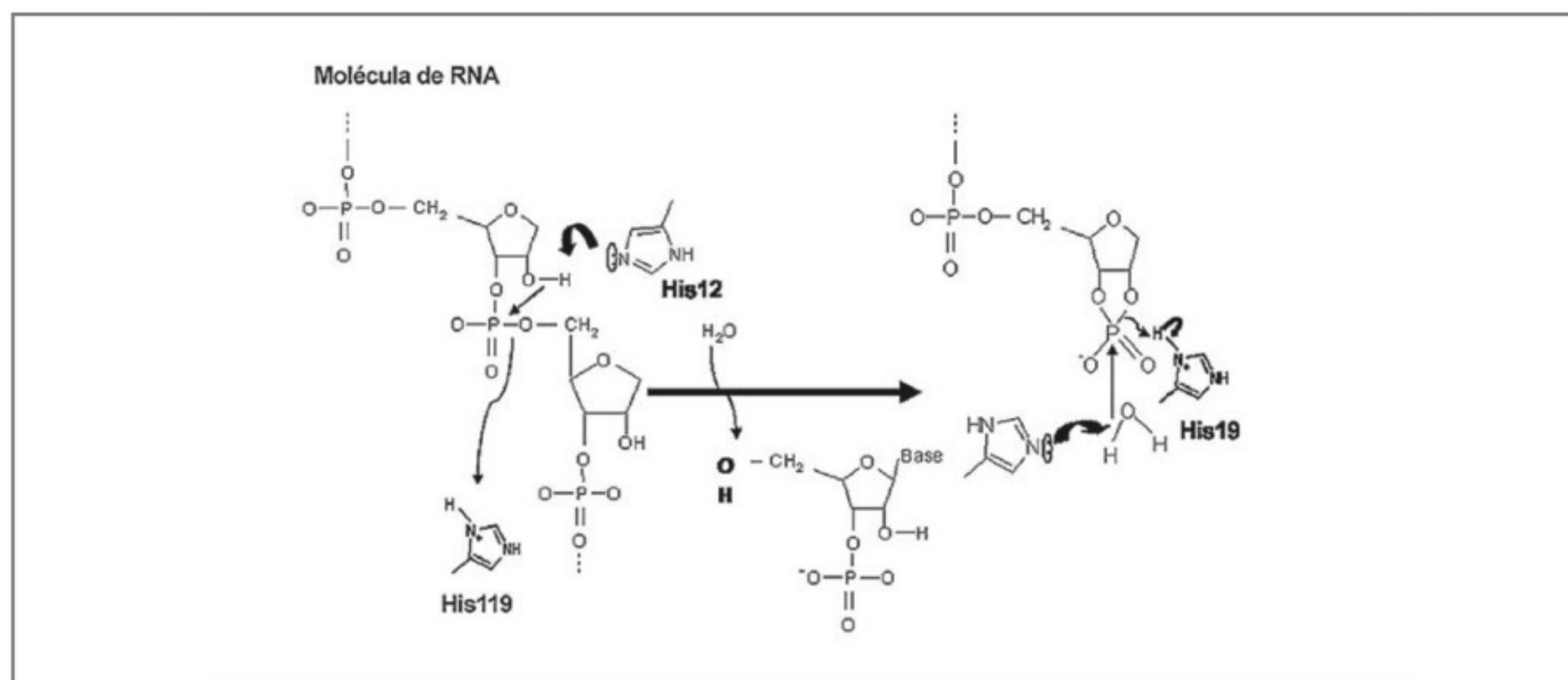


Figura 4.2 – Ação da RNase sobre a molécula de RNA. Os resíduos de histidina (His) agem como catalisadores ácidos e básicos (His 12 e His 119) que hidrolizam a molécula de RNA.

rantir a “pureza” do DNA, pois em meio básico ocorre a hidrólise da molécula de RNA, inativando-o.

O álcool isoamílico previne uma formação espumante da mistura após o uso de vórtice e auxilia na separação das fases aquosa e orgânica (Marmur, 1961). A proteína desnaturada forma uma camada na interfase entre as fases aquosa e orgânica, e é assim isolada do volume do DNA na fase aquosa. Esse procedimento é rápido e econômico.

Emprego de Sais

A solubilidade de uma proteína é afetada por diferentes concentrações de sais, na maioria das proteínas decresce com o aumento da concentração de sais. Esse efeito é chamado de precipitação salina (*salting out*) e é muito

utilizado em métodos de separação de proteínas e na purificação de amostras de ácidos nucleicos (Miller et al., 1988). Esse fenômeno aparentemente resulta do excesso de íons não ligados à proteína que competem com esta pelo solvente. A diminuição da solvatação e neutralização da força repulsiva permite à proteína agregar-se e precipitar. Existem algumas interações entre pH e concentração de sal. Em pH neutro, concentrações elevadas de sais são necessárias para a extração de proteínas.

O processo de precipitação ocorre quando as proteínas passam a interagir mais entre si do que com o solvente, que no caso é a água. As condições da solução são alteradas termodinamicamente, de forma a favorecer as interações entre as porções hidrofóbicas das proteínas e desfavorecer as interações com as moléculas de água.

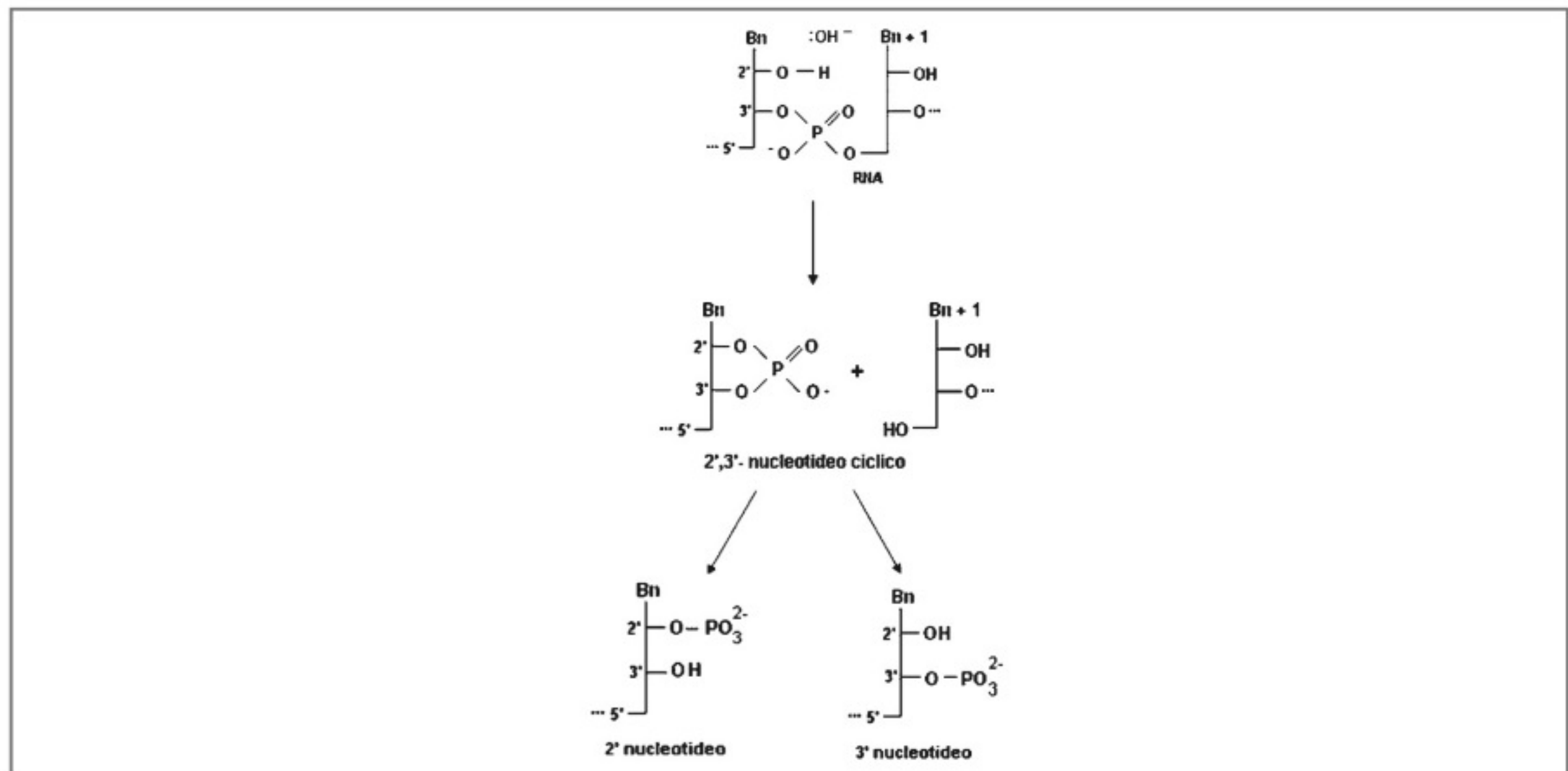


Figura 4.3 – Hidrólise da molécula de RNA catalisada por base. A base provoca a desprotonização do grupamento 2'-OH, ocorrendo o ataque nucleofílico ao átomo de fósforo adjacente. O nucleotídeo 2',3'-cíclico gerado é hidrolisado, resultando em dois compostos: 2'-nucleotídeo e 3'-nucleotídeo.

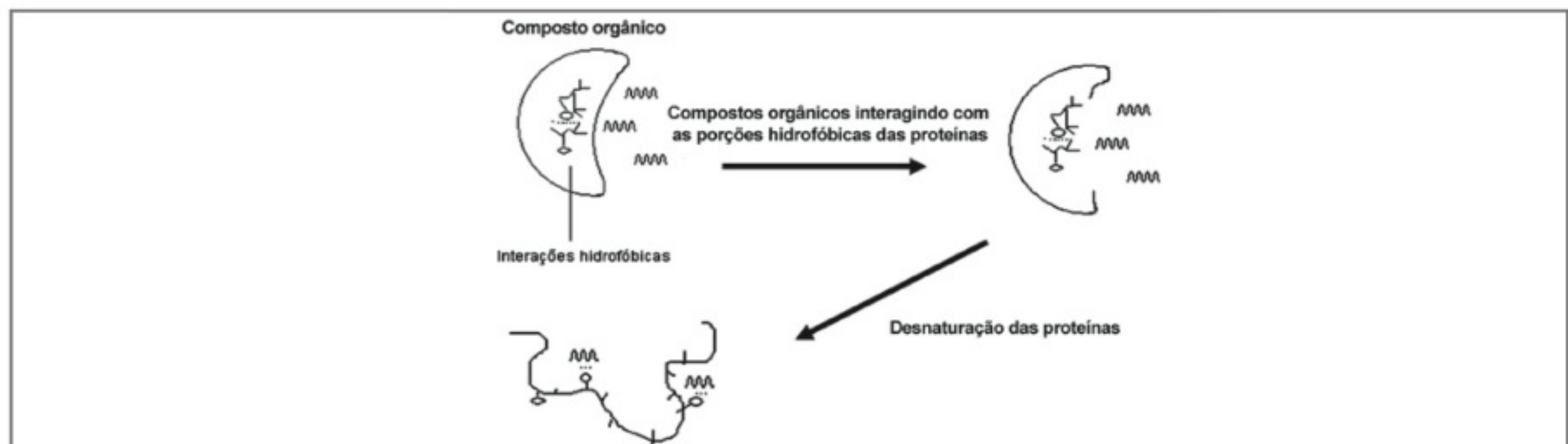


Figura 4.4 – Representação esquemática da interação entre solvente orgânico – proteína.

Altas concentrações de sais promovem a interação entre as superfícies hidrofóbicas e ocorre a agregação da forma proteica, separando-a da água. Nestas altas concentrações é termodinamicamente mais favorável para a água interagir com os íons livres na solução do que com as proteínas, visto que a entropia é maior neste último caso. O estado energeticamente mais favorável é aquele em que as porções hidrofóbicas das proteínas estão interagindo entre si por interações de van der Waals.

Os sais mais utilizados no processo de precipitação de proteínas como descrito acima são: acetato de sódio, acetato de amônio e cloreto de sódio.

Os dois primeiros são mais difíceis de remover em etanol a 70%, pois são mais solúveis do que o cloreto de sódio. O uso de acetato de amônio no lugar do acetato de sódio é utilizado preferencialmente para a precipitação de moléculas grandes de DNA. Assim, os oligonucleotídeos menores, de fita simples ou dupla (menor que 30 pb), e os nucleotídeos não incorporados, usados em reações de modificações de DNA, podem ser removidos das soluções de DNA por duas precipitações em etanol na presença de acetato de amônio.

Precipitação dos Ácidos Nucleicos

A precipitação do ácido nucleico faz-se através do uso de álcool, o qual diminui a solvatação das moléculas de água ao redor da fita de ácido nucleico, pois também é capaz de fazer pontes de hidrogênio com as moléculas de água fazendo com que a fita de DNA ou RNA precipite, sendo possível desta forma isolar a molécula.

O processo de precipitação utiliza inicialmente etanol (DNA) ou isopropanol (RNA) 100% seguida de lavagem com etanol 70. A lavagem com etanol 70% permite que sais utilizados ao longo do processo de extração ainda presentes no precipitado (sais que acabem precipitando juntamente com o ácido nucleico), sejam removidos, pois eles se dissolvem na solução aquosa. Desta forma, a lavagem do precipitado com etanol 70% permite um produto mais puro.

O etanol e o isopropanol são os álcoois de escolha para a precipitação de DNA e RNA respectivamente, devido ao fato de que os sais comumente empregados (acetato de sódio, cloreto de sódio, entre outros) durante as etapas de extração e purificação são mais solúveis nestes. O isopropanol é menos volátil do que o etanol e requer mais tempo para sua evaporação. Alguns sais são mais solúveis no isopropanol quando comparados com o etanol, podendo ser precipitados com o ácido nucleico.

Visualização do Ácido Nucleico

Normalmente, os ácidos nucleicos são visualizados com corantes que intercalam ou que se ligam às bases. Os corantes mais comumente empregados são: o brometo de etídio e SYBRTM green.

Brometo de Etídio

O brometo de etídio é um corante fluorescente que se intercala entre as bases empilhadas do DNA, resultando em aumento de fluorescência. A irradiação a um comprimento de onda de 302 nm excita o corante diretamente, provocando a emissão da fluorescência a 590 nm. A radiação ultravioleta a 254 nm é absorvida pelo DNA e transferida ao corante, o qual emite uma luz vermelho-laranja.

Quantidades pequenas (5 ng) de DNA podem ser visualizadas em gel de agarose contendo brometo de etídio. O RNA também pode ser visualizado com brometo de etídio, mais em menor grau.

SYBRTM green

Outros corantes já comercialmente disponíveis e que apresentam maior sensibilidade também estão sendo empregados na detecção direta do ácido nucleico, entre eles temos o SYBRTM green (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), um corante fluorescente que também se intercala na dupla fita de DNA, emitindo uma luz verde. Se há aumento do número de fitas de DNA, ocorre aumento da emissão de fluorescência. Esse corante é utilizado principalmente na técnica de PCR em tempo real. A preferência pela utilização do SYBRTM green é devido à elevada razão da fluorescência emitida quando está intercalado em uma dupla fita de DNA em relação à fita simples quando comparado ao brometo de etídio.

Nitrato de Prata

A visualização de ácido nucleico em gel de poliacrilamida é realizada principalmente pelo método de impregnação do DNA por nitrato de prata. Logo após a corrida eletroforética, o gel é fixado com uma solução de etanol e ácido acético, para impedir a eluição das amostras (formação de borões no gel). Em seguida, o gel é colocado por alguns minutos em uma solução de nitrato de prata. Este composto escurece quando oxidado, o que é feito passando o gel para uma solução contendo hidróxido de sódio e formaldeído. A coloração por prata é de mais fácil visualização do que a fornecida pelo brometo de etídio, além de ser mais segura, considerando o fato de que este é altamente carcinogênico.

Considerações Finais

Atualmente existem vários *kits* comerciais disponíveis para a obtenção de ácidos nucleicos que são frequentemente empregados nos laboratórios de Biologia Molecular. Alguns reagentes descritos neste capítulo fazem parte das soluções que acompanham esses *kits* comerciais. Há também kits que são acompanhados por colunas que contêm membranas nas quais os ácidos nucleicos ficam retidos, permitindo que sejam melhor purificados.

Referências

- Bollag, D.M.; Rozycki, M.D.; Edelstein, S.J. Preparation for protein isolation. In: *Protein Methods*. Chapter 1. Wiley-Liss, Inc., New York, NY, 1996, p. 32-33.
- Grossowicz, N.; Ariel, M. Methods for Determination of lysozyme activity. In: David, G. *Methods of Biochemical Analysis*. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, 1983, p. 435-39.
- Lahiri, D.K.; Schnabel, B. DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of MgCl₂, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality. *Biochem. Genet.*, 31(7-8): 321-328, 1993.
- Marmur, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. Mol. Biol.*, 3: 208-18, 1961.
- Miller, S.A.; Dykes, D.D.; Polesky, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, 16(3): 1215, 1988.
- Voet, D.; Voet, J.G., Prott, C.W. Estrutura dos ácidos nucleicos. In: *Fundamentos de Bioquímica*. Porto Alegre, Artes Médicas Sul, Porto Alegre, RS, 2000, p. 744.
- Volkin, E.; Cohn, W.E. Estimation of nucleic acids. In: David, G. *Methods of Biochemical Analysis*. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, 1983, p. 287-302.
- Sambrook, L.E.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed., New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Sambrook, J.; Russell, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed., New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Appendix 1 A4.50, 2001.

5. Separação e Identificação de Ácidos Nucleicos e Proteínas por Eletroforese

Fernando Rodrigues de Moraes Abdulkader
Rozangela Verlengia
Rui Curi

Introdução

A eletroforese é uma das técnicas mais empregadas atualmente na área das ciências biológicas e da saúde para a separação e identificação de compostos de interesse biológico. O termo eletroforese possui, na verdade, um significado muito mais amplo do que uma técnica de separação e caracterização de substâncias. A etimologia revela que “eletroforese” é uma palavra composta pela combinação de um termo de origem grega – *electro* – que se refere a cargas elétricas, com um termo de origem latina – *phoresis* – que denota a ação de carregar, levar. Ou seja, a eletroforese refere-se a cargas elétricas carregadas, no caso, por um campo elétrico. Dessa forma, podemos definir a eletroforese como a *migração de cargas elétricas em solução na presença de um campo elétrico*.

Uma série de fenômenos observados nos sistemas biológicos, como o transporte de íons através da membrana celular, é também eletroforética. Nesse caso, a presença de um potencial de membrana implica a existência de um campo elétrico através da membrana plasmática, em que o citoplasma é negativo em relação ao meio extracelular, direcionando a entrada de cátions para o interior da célula, e a saída de ânions através de canais protéicos na membrana.

Da definição de eletroforese, vemos que há pelo menos dois requisitos para que possa ser empregada como técnica de separação: as substâncias a serem separadas devem apresentar cargas e um campo elétrico deve ser aplicado à solução em que as substâncias estão presentes.

Separação Eletroforética de Ácidos Nucleicos e Proteínas

Os ácidos nucleicos e as proteínas constituem dois polímeros biológicos chave no mecanismo celular. Essas substâncias, devido ao fato de apresentarem cargas elé-

tricas, podem, portanto, sofrer o processo de eletroforese, possibilitando sua separação e caracterização.

Na verdade, a separação eletroforética ocorre principalmente com base em duas propriedades: a carga elétrica das substâncias e seu peso molecular. Isso porque essas propriedades determinam a velocidade com que as substâncias migram no campo elétrico. Vejamos como a carga e o tamanho podem influenciar a migração eletroforética.

Quanto mais intensa for a carga da substância, maior será sua atração pelo polo de sinal oposto. Sendo assim, por exemplo, uma substância com carga 2+ migrará mais lentamente em direção ao polo negativo do que uma substância de mesmo tamanho com carga 4+. Além disso, substâncias com cargas de sinal oposto migram em direções opostas. Já quanto maior for o peso molecular, menor será a velocidade de migração, isso porque a substância sofre um atrito maior com o meio por onde está migrando.

Os ácidos nucleicos apresentam cargas devido à presença de grupos fosfato nas ligações fosfodiéster que unem os nucleotídeos entre si (Fig. 5.1). Dessa forma, os ácidos nucleicos apresentam cargas negativas. Na eletroforese, os ácidos nucleicos são, portanto, atraídos pelo polo positivo, migrando em sua direção.

Devido à estrutura polimérica repetitiva dos ácidos nucleicos (fosfato, açúcar, base nitrogenada), a razão entre o número de cargas negativas presentes em um ácido nucleico e seu peso molecular (em unidades de massa atômica – u.m.a.) é praticamente constante. Por exemplo, analisando a figura 5.1, a cada par de nucleotídeos pareados temos:

- Duas cargas negativas;
- Dois grupamentos fosfato (190 u.m.a.);

- Duas desoxirriboses (83 u.m.a.);
- Um par de bases A-T (258 u.m.a.) ou C-G (260 u.m.a.); fornece uma proporção de aproximadamente 266 u.m.a. por carga negativa, que independe do tamanho do ácido nucleico ou da sua sequência de nucleotídeos. Ou seja, a atração relativa em direção ao polo positivo é a mesma, não importa qual seja o tamanho do ácido nucleico. Dessa forma, os ácidos nucleicos não são separados por eletroforese com base na sua carga total, mas somente com base em seu tamanho.

Já as proteínas constituem uma situação mais complexa. As proteínas são polímeros de aminoácidos e, nesse caso, os aminoácidos que constituem uma proteína influem decisivamente na carga da proteína. Alguns aminoácidos apresentam grupos que podem estar carregados positiva (por exemplo, a lisina, com o grupo $-\text{NH}_3^+$) ou negativamente (por exemplo, o ácido aspártico, com o grupo $-\text{COO}^-$).

Sendo assim, dependendo da proporção entre aminoácidos carregados positiva ou negativamente, as proteínas podem ter cargas totais positivas ou negativas. No caso de uma proteína com carga total positiva, ela irá migrar em direção ao polo negativo, o contrário ocorrendo com uma proteína carregada negativamente.

O pH da solução influi também nas cargas de uma proteína (Fig. 5.2). Um pH muito baixo pode protonar grupos $-\text{COO}^-$, diminuindo as cargas negativas da proteína. Da mesma forma, um pH muito alto pode desprotonar grupos $-\text{NH}_3^+$, diminuindo as cargas positivas da proteína. Dessa forma, dependendo do pH do meio, uma mesma proteína pode ora migrar em direção ao

polo positivo ora ao negativo, ou até mesmo não migrar em direção a polo nenhum.

Todas as proteínas apresentam, em um dado pH (característico de cada proteína), um número de grupos carregados positivamente ($-\text{NH}_3^+$) igual ao número de grupos carregados negativamente (COO^-): o chamado *ponto isoelétrico* – pI. No seu ponto isoelétrico, a proteína não apresenta uma carga total e, portanto, não é atraída em direção a nenhum dos polos elétricos, não sendo possível realizar a eletroforese. Contudo, para separar uma mistura de proteínas, existem técnicas eletroforéticas que se valem da existência de pontos isoelétricos, como a *focalização isoelétrica* (ver detalhes no Capítulo 24) e a *contraímuno-eletroforese*. Por outro lado, existem procedimentos que fazem com que a proteína adquira uma carga negativa homogênea, independentemente da sua sequência de aminoácidos, como é o caso da técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Sulfato de Sódio Dodecila (PAGE-SDS), que discutiremos adiante.

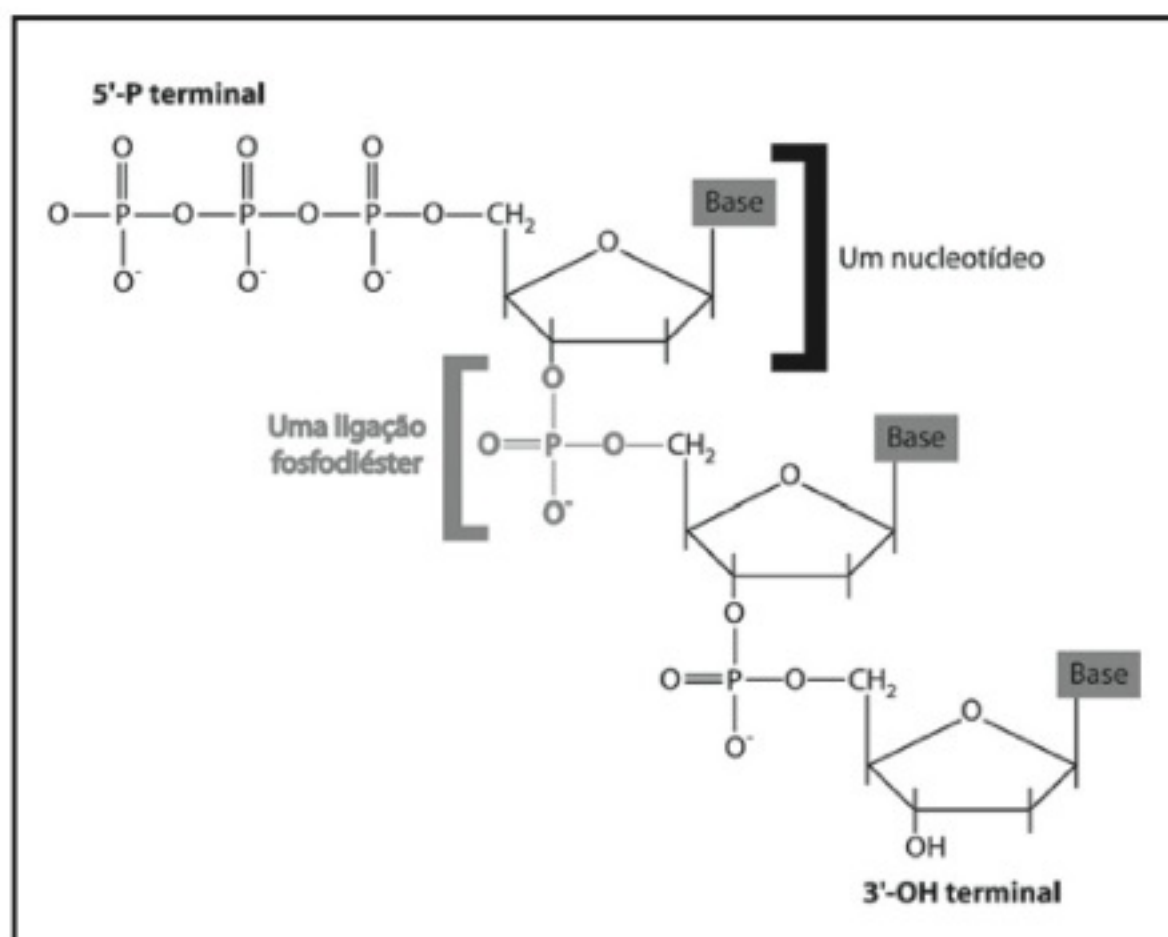


Figura 5.1 – Representação esquemática da estrutura de um ácido nucleico (DNA).

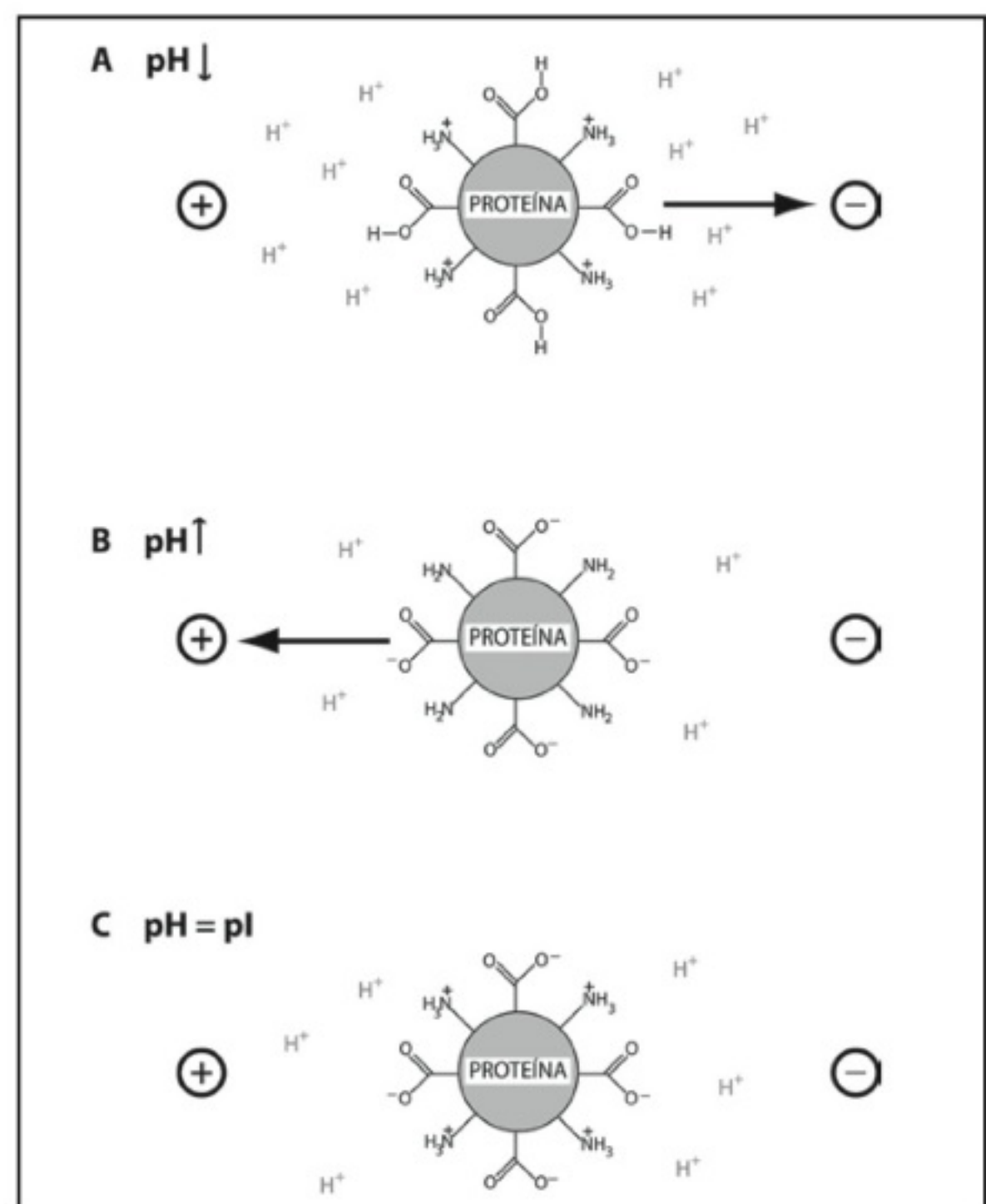


Figura 5.2 – Efeito do pH sobre a migração eletroforética de proteínas. (A) Em pH baixo (meio ácido), as proteínas têm carga total positiva, sendo atraídas em direção ao polo negativo. (B) Em pH elevado (meio básico), as proteínas têm carga total negativa, sendo atraídas em direção ao polo positivo. (C) Em pH igual a seu ponto isoelétrico (pI), uma proteína não tem carga total (o número de cargas positivas é igual ao de cargas negativas) e assim não migra no campo elétrico.

Técnica de Eletroforese para a Separação de Proteínas e Ácidos Nucleicos

O primeiro protocolo para a separação de proteínas por eletroforese foi desenvolvido por Arne Tiselius, em 1937, o que lhe valeu o prêmio Nobel em 1948. Tiselius utilizava um tubo em U, preenchido com solução eletrolítica, em cujos bocais eram colocados eletrodos ligados a uma fonte de tensão elétrica contínua. Em um dado ponto do tubo era aplicado um certo volume de soro humano e, com a fonte de tensão ligada, observava-se uma separação em “blocos” de proteínas que, no entanto, por vezes apresentavam regiões de sobreposição. Apesar de requerer grandes volumes de amostra e a separação não ser perfeita, a técnica de Tiselius foi um grande avanço e possibilitou o desenvolvimento das técnicas eletroforéticas atuais.

Atualmente, as técnicas mais empregadas de eletroforese são realizadas em suportes, e não em soluções “livres”. O uso de suportes impede movimentos de convecção do líquido por aquecimento, decorrente da aplicação de tensão elétrica, bem como de outras fontes de perturbação mecânica que possam prejudicar a separação das substâncias.

A eletroforese em suportes é conhecida como eletroforese em zona, porque a separação da amostra é bastante eficiente, delimitando, no suporte, bandas – zonas – de cada fração da mistura de proteínas, ou ácidos nucleicos. Dentre outras vantagens está o emprego de pequenas quantidades de amostra (poucos microlitros), permitindo assim que um mesmo suporte possa ser utilizado para a separação de várias amostras ao mesmo tempo (Fig. 5.3).

No entanto, essas bandas não são visíveis a olho nu e precisam ser coradas com um agente revelador. No caso de proteínas, existem corantes específicos, como o Coomassie Brilliant Blue e o vermelho de Ponceau. Já no caso dos ácidos nucleicos, o corante mais utilizado é o brometo de etídio, que se intercala entre os pares de bases nitrogenadas, devido a sua estrutura planar, emitindo fluorescência sob luz ultravioleta. Note-se que o brometo de etídio deve ser manuseado com extremo cuidado, por ser cancerígeno. Outro corante para ácidos nucleicos é o SYBRTM green. A impregnação por prata também pode ser utilizada para revelar tanto proteínas quanto ácidos nucleicos. A coloração com sais de prata para proteínas tem sido bastante empregada em técnicas de eletroforese bidimensional (ver detalhes no Capítulo 24), pois permite a detecção de quantidades muito pequenas de proteínas.

Essa técnica baseia-se na complexação de íons prata por resíduos de aminoácidos, como a cisteína. Os íons prata são reduzidos a prata metálica, que precipita, portanto, nas regiões do gel que contêm proteínas.

Suportes Empregados na Eletroforese

Existem dois tipos básicos de suporte para eletroforese: os suportes de papel e derivados, e os suportes de gel.

O representante mais comum dos suportes de papel e derivados é a fita de acetato de celulose. Macromoléculas como proteínas e ácidos nucleicos não interagem muito com esse tipo de material, fazendo com que a fricção que experimentam com o meio seja pequena, devido à presença de poros muito grandes nesse material. Com isso, as substâncias são principalmente separadas com base na intensidade das suas cargas.

Esse sistema é usado em laboratórios de análises clínicas para a separação de proteínas, que apresentam cargas diferentes. Por exemplo, é bastante utilizado para a separação das frações das proteínas séricas e para a caracterização de hemoglobinas variantes, como as hemoglobinas S e C. Apesar de não promover uma separação tão boa quanto a eletroforese em gel, o acetato de celulose é uma alternativa bastante econômica, por ser um material inócuo, relativamente barato, no qual as bandas podem ser fácil e rapidamente coradas. No entanto, o acetato de celulose não pode ser empregado para a separação de ácidos nucleicos, uma vez que todos eles apresentam a mesma densidade de carga negativa, sendo igualmente atraídos em direção ao polo positivo. Porém, não conseguem ser separados com base em seus tamanhos, uma vez que, como vimos, esse suporte não promove esse tipo de separação.

Os suportes de gel, por sua vez, são de escolha para a separação de ácidos nucleicos e para a caracterização do peso molecular de proteínas. Os dois tipos de gel mais empregados são os de agarose – um polissacarídeo de origem vegetal – e os de poli(acrilamida) – gerado pela reação de polimerização da acrilamida com a metileno-bis-acrilamida. Esses géis são constituídos por uma trama de polímero que aprisiona a solução eletrolítica na qual a eletroforese se desenvolve. Dessa forma, a fricção das macromoléculas com o suporte de gel é muito maior do que nos suportes de papel, fazendo com que o tamanho da molécula influencie de forma preponderante na sua migração eletroforética. Na eletroforese em gel, portanto, os ácidos nucleicos são separados com base em seu tamanho, já que, como discutimos acima, essas macromoléculas apresentam a mesma densidade de carga negativa.

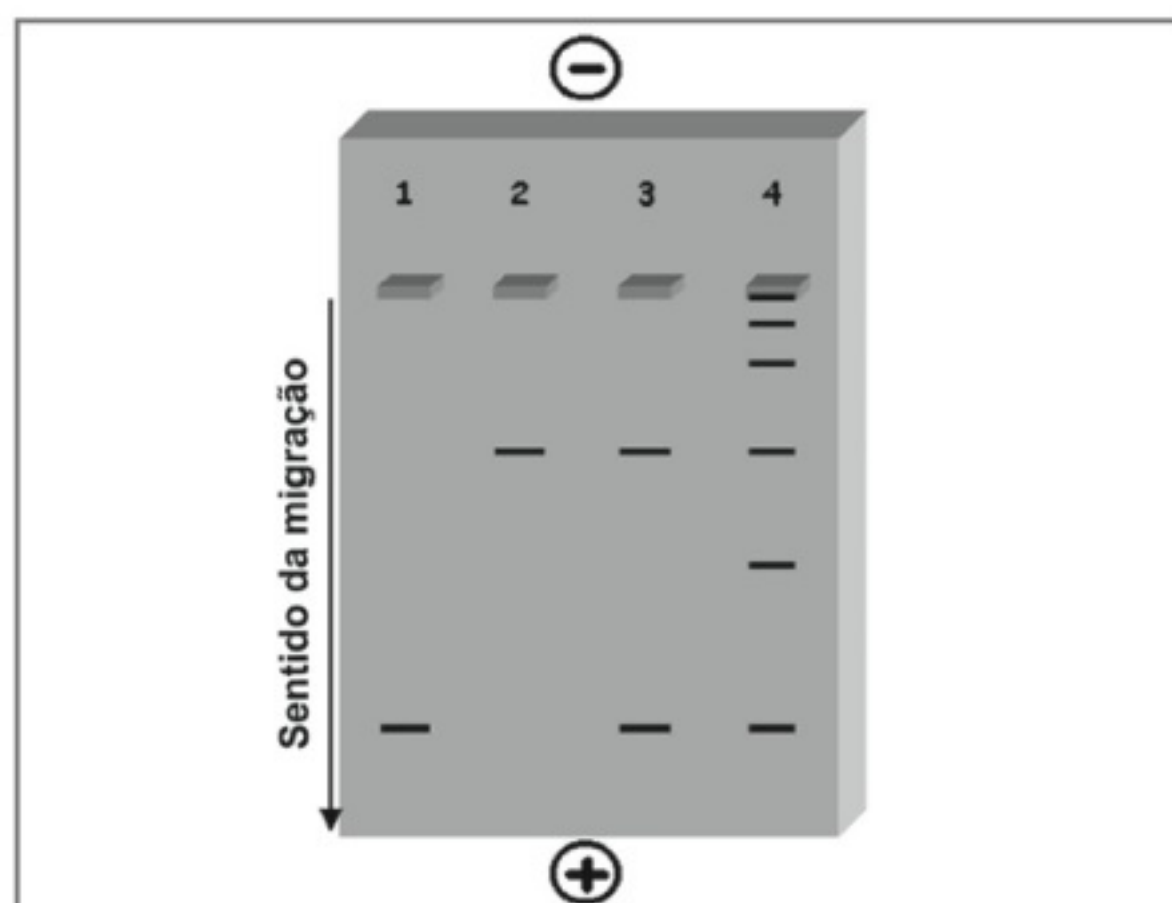


Figura 5.3 – Representação esquemática da separação eletroforética de ácidos nucleicos em gel (eletroforese em zona) – como são moléculas negativas, os ácidos nucleicos são atraídos em direção ao polo positivo. No gel representado acima existem quatro poços, numerados de 1 a 4, onde são aplicadas as amostras: 1. somente um tipo de molécula foi aplicado; 2. somente um tipo de molécula foi aplicado de tamanho molecular maior do que aquela em 1; 3. mistura das moléculas 1 e 2 foi aplicada no poço e separada no gel; 4. uma mistura de moléculas com peso conhecido foi aplicada (padrão de peso molecular).

Por outro lado, a eletroforese em gel de proteínas promove a separação com base na carga e peso molecular das proteínas. Mas, se as proteínas são tratadas com um detergente aniônico chamado sulfato de sódio dodecila (SDS), essas adquirem uma carga negativa homogênea, decorrente da adsorção do detergente. Normalmente, as proteínas tratadas com esse detergente são separadas em gel de poliacrilamida, em eletroforese conhecida como PAGE-SDS (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Sulfato de Sódio Dodecila do inglês *sodium dodecyl-sulfate polyacrilamide gel electrophoresis*). Dessa forma, as proteínas ficam todas com a mesma densidade de cargas negativas, tendendo a migrar em direção ao polo positivo. Nesse caso, o único fator que influencia a velocidade de migração eletroforética é a fricção com o meio. Ou seja, as proteínas são separadas com base em seus tamanhos, sendo que as proteínas menores migram mais rápido do que as maiores, o que permite determinar o peso molecular de cada proteína presente na amostra.

O peso molecular, tanto das proteínas tratadas com SDS quanto dos ácidos nucleicos, pode ser determinado por comparação. No mesmo gel é aplicada, em paralelo, uma amostra com uma mistura de ácidos nucleicos, ou proteínas, com pesos moleculares conhecidos – o chamado *padrão de peso molecular*. Sabendo-se qual o peso de cada um dos componentes do padrão e comparando-se a posição de cada um deles com a posição de corrida

da amostra desconhecida, pode-se estimar seu peso molecular (Fig. 5.3).

Existem preparações comerciais de padrões de peso molecular de tamanhos bem determinados. No caso de padrões para ácidos nucleicos, por exemplo, existem misturas de fragmentos de DNA que diferem de 100 pares de base (pb) entre si. Existem padrões adequados para cada tipo de separação que se deseja realizar. Alternativamente a esses produtos comerciais, podem-se utilizar fragmentos de digestão com enzimas de restrição de certos genomas bem conhecidos, como plasmídeos. Dados sobre tamanhos dos fragmentos de digestão de diversas moléculas de DNA com diferentes enzimas de restrição podem ser facilmente encontrados na literatura especializada.

Fatores que Influenciam a Separação Eletroforética

Qualquer fator que suscite a atração das substâncias pelos polos do campo elétrico, ou a fricção das moléculas com o suporte, influenciará a migração e a separação eletroforética. Vejamos quais são os fatores mais comuns.

pH

O pH do meio, por influenciar no estado de ionização dos aminoácidos, afeta decisivamente a migração eletroforética de proteínas. Por isso, o pH do tampão de corrida deve ser cuidadosamente selecionado de forma a satisfazer as necessidades da separação que se almeja. Por exemplo, o pH de trabalho para a separação das proteínas do soro (pH 8,6) em acetato de celulose é ajustado de forma que a albumina, proteína em maior quantidade no soro, apresente a maior carga negativa e, portanto, a maior migração eletroforética em direção ao polo positivo.

Conformação Tridimensional

A própria forma da macromolécula, além do seu peso molecular, pode afetar a migração eletroforética, principalmente em géis. Moléculas filamentosas sofrem mais atrito com a rede de polímeros do que moléculas de mesmo tamanho e carga, mas com forma esférica. Um exemplo claro desse tipo de diferença pode ser encontrado na eletroforese em gel de plasmídeos (pequenas moléculas de DNA circular). Uma amostra pura de um dado plasmídeo pode apresentar três bandas separadas se submetida à eletroforese: as bandas de maior migração correspondem a formas do plasmídeo enoveladas aproximadamente esféricas (*supercoil* – superenoveladas), en-

quanto as bandas de menor migração correspondem às formas estendidas (filamentosas) do plasmídeo: a forma circular e a forma linear (aberta).

Devido à diversidade de estruturas terciárias, a migração eletroforética das proteínas em sua forma nativa é dependente da conformação espacial dessas macromoléculas também, além de seu peso molecular, o que pode implicar que proteínas de mesmo tamanho tenham migrações eletroforéticas diferentes, caso uma seja globular e a outra filamentosa, da mesma forma que os plasmídeos discutidos acima. Dessa forma, muitos protocolos de eletroforese envolvem condições desnaturantes, utilizando, por exemplo, 2-mercaptoetanol (que reduz pontes de dissulfeto) ou ureia. O SDS empregado em eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida também é um agente desnaturante, que faz com que as proteínas, independentemente da sequência de aminoácidos, adquiram um formato semelhante. Vejamos como o SDS e a ureia podem ser utilizados na SDS-PAGE.

Os géis de poliacrilamida requerem um sistema tampão capaz de dissociar as proteínas em subunidades polipeptídicas individuais. O mais comum agente dissociante usado é o SDS. A mistura de proteínas é desnaturada por meio do aquecimento a 100°C na presença de excesso de SDS e um reagente tiol que cliva as pontes de dissulfeto (usualmente 2-mercaptoetanol ou ditiotreitol). Sob essas condições, a maioria dos polipeptídeos liga-se ao SDS em uma taxa de peso constante (1,4 g de SDS por grama de polipeptídeo). A carga intrínseca dos polipeptídeos torna-se insignificante quando comparada às cargas negativas promovidas através da ligação com o detergente. Assim, os complexos SDS-polipeptídeo têm essencialmente densidades de cargas idênticas e migram no gel de poliacrilamida de acordo com o tamanho do polipeptídeo, como discutimos acima.

A ureia é outro agente desnaturante, pois age rompendo as pontes de hidrogênio. Altas concentrações de ureia são necessárias (~8 M), bem como a presença de um reagente tiol, para completar a desnaturação das proteínas. A ureia deve estar presente durante a separação eletroforética para manter o estado de desnaturação.

A vantagem da ureia é que, para algumas aplicações, esta não afeta a carga intrínseca das proteínas e assim a separação dos polipeptídeos constituintes está relacionada tanto ao tamanho quanto à carga, em contraste com o uso do SDS. Uma desvantagem é que esta combinação do fracionamento do tamanho e carga impede a determinação precisa do peso molecular. Além disso, a ureia não é tão eficiente em dissociar as proteínas quanto o SDS. Nesse

sentido, 50% ou mais da mistura do complexo de proteína dissociado com ureia poderá ter dificuldade de entrar e de separar-se eficientemente no gel. Por outro lado, a dissociação realizada por SDS permite uma eficiência de 90% de entrada e separação no gel. Contudo, em alguns casos é necessária tanto a presença do SDS quanto da ureia como agentes desnaturantes.

Atrito Oferecido pelo Gel

Um fator que muitas vezes é deliberadamente manipulado pelo experimentador é a concentração do gel empregado, no caso do gel de agarose, ou a proporção entre os monômeros formadores do gel, no caso do gel de poliacrilamida. Se um gel é feito mais concentrado (agarose), ou se o polímero formado tem poros menores (poliacrilamida), maior será o atrito que as espécies carregadas sofrem com o suporte.

No entanto, a relação entre o atrito oferecido pelo gel e o tamanho da molécula não é linear. Por exemplo, dobrando-se a concentração de um gel, uma dada molécula pode ter sua velocidade de migração eletroforética diminuída, digamos, pela metade. Já uma molécula com o dobro do seu tamanho pode ter sua migração diminuída, por exemplo, para $1/16$ da migração original.

Esses exemplos são um tanto extremos, mas ilustram uma propriedade importante dos géis: quanto maior a fricção oferecida pelo gel – seja por uma concentração maior do polímero, seja por uma diminuição do tamanho dos poros, maior a eficiência de separação das bandas, isto é, maior a *resolução* do gel. No entanto, se a concentração do gel for muito grande, ou o tamanho dos poros for muito pequeno, a separação das bandas pode nem chegar a ocorrer, uma vez que a migração eletroforética fica praticamente bloqueada. Dessa forma, parte do trabalho de padronização de uma eletroforese consiste em ajustar a concentração ou a porosidade do gel, de forma a permitir uma corrida eletroforética satisfatória, com uma boa resolução das bandas e em um intervalo de tempo adequado.

Eletroendosmose

Outro fator que deve ser considerado, principalmente na *eletroforese* em gel, é o fenômeno da eletroendosmose. A eletroendosmose, ou eletrosmose, corresponde a um fluxo de cargas positivas (como íons H^+ e outros cátions presentes no tampão de preparo do gel) que carrega consigo moléculas de água em direção ao polo negativo. Sua origem se deve ao fato de que alguns suportes podem conter cargas negativas em sua estru-

tura, que são atraídas em direção ao polo positivo. Mas, como essas cargas estão imobilizadas, seu fluxo que deveria ocorrer em direção ao polo positivo é compensado pelo fluxo equivalente de cargas positivas na solução em direção ao polo negativo, o que corresponde ao fluxo eletrosmótico citado acima.

Por conseguinte, a eletroendosmose pode dificultar a migração eletroforética de macromoléculas em direção ao polo positivo, já que corresponde a um fluxo de solução no sentido contrário ao fluxo eletroforético. Além de interferir na migração, a eletroendosmose pode dispersar as frentes de migração das macromoléculas, gerando bandas mais largas e, portanto, diminuindo a resolução do gel. Apesar desses problemas, existem técnicas que se utilizam do fluxo eletrosmótico para a identificação de certas substâncias, como a *eletroforese capilar* (empregada para a separação de substâncias relativamente menores do que proteínas e ácidos nucleicos) e a *contra-imunoeletroforese* (em que o pH do tampão do gel corresponde ao pI das imunoglobulinas, que são aplicadas junto ao polo positivo e carregadas pelo fluxo eletrosmótico em direção a um dado antígeno que, carregado negativamente, migra no sentido contrário).

Eletroforese em Gel de Agarose

A agarose é um polissacarídeo purificado a partir de algas vermelhas. Quando aquecida em solução aquosa, acima de 60°C, a agarose é solubilizada e, com o resfriamento da solução, adquire um aspecto gelatinoso decorrente da formação de duplas hélices do polissacarídeo, que se agregam em filamentos relativamente grossos (Fig. 5.4). O tamanho do poro do gel de

agarose pode ser regulado pela proporção de agarose na solução.

A agarose, na sua forma nativa, apresenta um grau apreciável de eletroendosmose, devido à presença de resíduos de ácido sulfônico (grupos $-\text{SO}_3^-$). Contudo, atualmente, com o avanço tecnológico, as diversas preparações comerciais têm o grau de eletroendosmose diminuído com procedimentos que reduzem o número de grupos polares restantes no polímero.

Os géis de agarose não são muito utilizados nos laboratórios de pesquisa para a separação de proteínas. Para essas substâncias, utilizam-se géis de agarose chamados *não restritivos*, cuja concentração de agarose é relativamente pequena. Normalmente, os géis não restritivos são preparados com proporções de agarose entre 0,6% e 1% (m/v), cujos diâmetros de poro estão entre 500 nm e 150 nm, respectivamente. Esses géis são mais empregados em análises clínicas, para a separação de proteínas séricas ou em diversas técnicas de imunoeletroforese.

Os géis de agarose *restritivos* (proporção de agarose > 1%) apresentam um grande poder de resolução. Porém, não são úteis para a separação de proteínas, por serem muito densos e apresentarem um grau de eletroendosmose que dificulta bastante a migração eletroforética dessas moléculas. No entanto, é o método de escolha para a separação de ácidos nucleicos cujos tamanhos diferem por mais de alguns poucos nucleotídeos, principalmente fragmentos de digestão com enzimas de restrição, por permitirem uma separação rápida e eficiente. Na tabela 5.1 tem-se as concentrações de agarose apropriadas para a separação de fragmentos de ácidos nucleicos de diversos tamanhos.

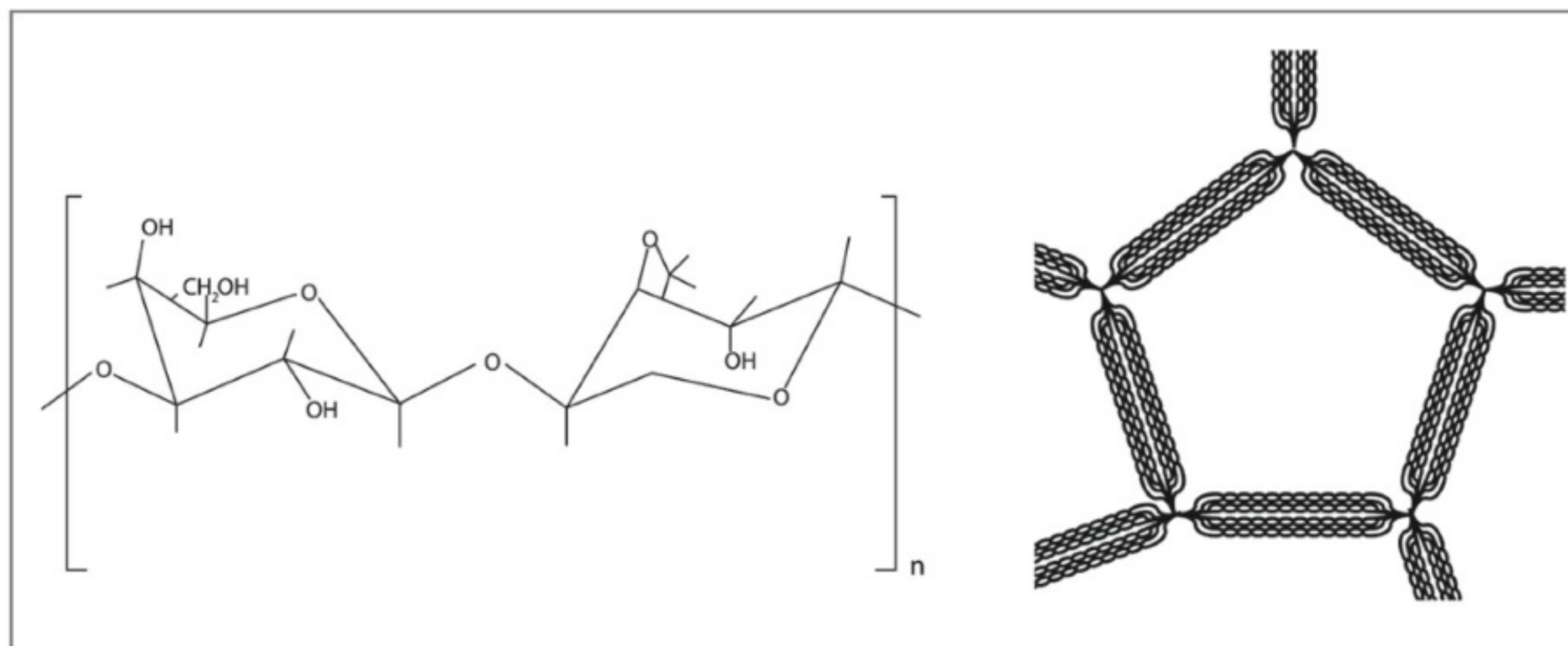


Figura 5.4 - Estrutura química da agarose e dos polímeros durante a formação do gel.

Géis de Agarose Desnaturantes

Gel de Agarose Alcalino

Este gel é empregado para separar DNA de fita simples de longa extensão, como os gerados por meio de ensaio de proteção à nuclease S1, ou durante a preparação de bibliotecas de cDNA.

Gel de Agarose Desnaturante Formaldeído

Este gel promove um sistema de eletroforese usado para o fracionamento de RNA com base no tamanho da molécula.

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

O gel de poliacrilamida resulta da polimerização dos monômeros de acrilamida dentro de cadeias longas e da sua ligação cruzada através de componentes bifuncionais, tais como N,N"-metileno bisacrilamida (usualmente abreviado como bisacrilamida, reagindo com os grupos funcionais no término da cadeia), como mostra a figura 5.5. O tamanho efetivo do poro, brilho, desvio de luz e propriedades de dilatação do gel de poliacrilamida variam de acordo com a proporção das ligações cruzadas entre os monômeros de acrilamida e bisacrilamida.

Tabela 5.1 – Concentração dos géis de agarose para a separação de moléculas de DNA lineares.

Concentração de agarose (%)	Tamanho do fragmento de DNA
0,3	5 - 50 kb*
0,6	1 - 23 kb
0,8	800 pb - 10 kb
1,0	400 pb - 8 kb
1,2	300 pb - 7 kb
1,5	200 pb - 4 kb
2,0	100 pb - 3 kb
3,0	100 pb - 1 kb
4,0	50 - 500 pb**
5,0	10 - 500 pb
6,0	10 - 100 pb

Modificado de Brown T.A.: *Molecular Biology Labfax*. Vol II: Gene Analysis. San Diego, Academic, 1998, 2nd ed.

*kb-quilobases / **bp-pares de base

Gel de Poliacrilamida Nativo para Resolver Pequenos Fragmentos de DNA

Géis de poliacrilamida são úteis para separar pequenos fragmentos de DNA variando em tamanho de 10 a 1.500 pares de bases. A resolução superior à dos géis de agarose para fragmentos 0 a 500 pares de bases permite a separação de fragmentos que diferem entre si de 10 a 20 pares de bases. Os géis de poliacrilamida podem também ser usados para separar moléculas de DNA de fita simples, com uma taxa de migração que depende tanto do tamanho quanto da estrutura secundária. Por outro lado, esses géis não são recomendados para promover a separação de fragmentos com tamanho superior de 3.000 bp (Tabela 5.2).

As amostras de ácido nucleico separadas nesta matriz podem ser usualmente purificadas por meio da excisão e eletrocluição. Este procedimento produz fragmentos que são excelentes substratos para a digestão com enzima de restrição, ligação e marcação, entre outras.

Sistema de Gel Desnaturante para Resolução de DNA ou RNA de Fita Simples

Gel de Poliacrilamida Desnaturante

O gel desnaturante contendo 8 M de ureia constitui um sistema de eletroforese com alta resolução, adequado

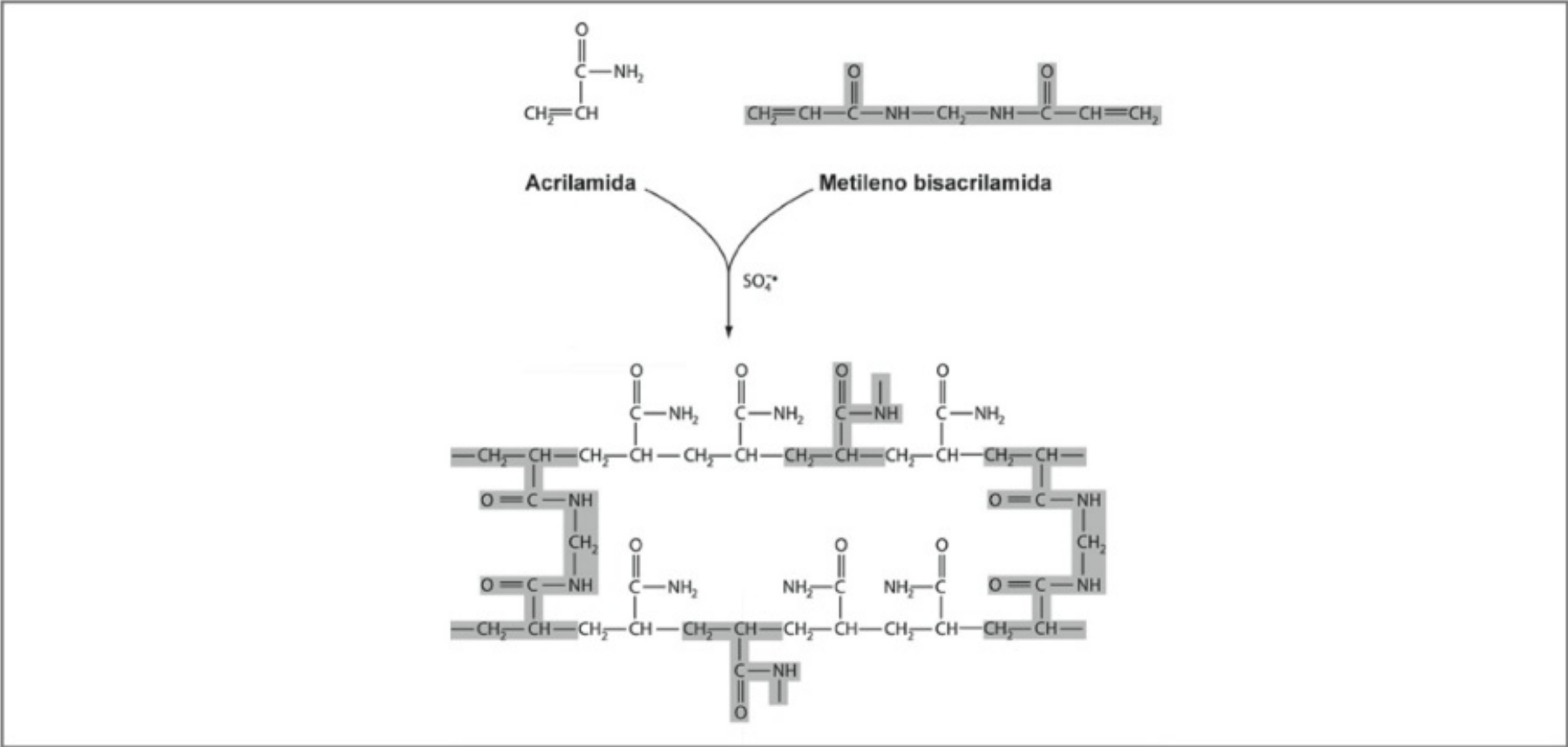


Figura 5.5 – Reação de polimerização da acrilamida com o metileno bisacrilamida formando o gel de poliacrilamida.

Tabela 5.2 – Migração linear de DNAs de fita dupla e marcadores (corantes) sob gel de poliacrilamida nativo.

% Poliacrilamida	Tamanho médio do DNA (bp) separação ótima	Xileno cianol*	Azul de bromofenol*
3,5	1.000-2.000	460	100
5,0	80-500	260	65
8,0	60-400	160	45
12,0	40-200	70	20
15,0	25-150	60	15
20,0	6-100	45	12

Fonte: Baseado em Sambrook e Russell. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Plainview – New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. Capítulo 5.
*Corante poderá comigrar com os fragmentos de DNA de tamanhos (bp) descritos na tabela.

para separar fragmentos com menos de 400 bases em extensão tabela 5.3. Diferenças em nucleotídeos simples podem ser detectadas com esses géis, o que é o requisito fundamental para o sequenciamento de DNA. Esse gel pode ser usado para purificar oligonucleotídeos marcados ou não. O gel de poliacrilamida desnaturante é também usado para analisar resultados de experimentos da reação em cadeia pela polimerase, proteção S1 e proteção à ribonuclease.

A desvantagem dos géis de poliacrilamida é o tempo extra requerido para prepará-los e corrê-los (usualmente algumas horas).

Gel de Poliacrilamida para Separação Eletroforética de Proteínas

Géis com concentrações de acrilamida menores que 2,5% são necessários para a separação das moléculas de proteínas com peso molecular maior que 10⁶ Daltons. Por outro lado, géis de poliacrilamida com uma concentração de 30% de acrilamida possibilitam separar polipeptídeos com peso molecular de até 2000 Daltons. Na tabela 5.4 podemos observar a relação entre a concentração de bisacrilamida e a resolução da separação dos fragmentos.

Tabela 5.3 – Faixa de resolução de géis contendo diferentes concentrações de poliacrilamida em gel desnaturante.

Acrilamida (%)	Tamanho dos oligonucleotídeos separados (em bases)
20-30	2-8
15-20	8-25
13-15	15-35
10-13	35-45
8-10	45-70
6-8	70-300

Fonte: Baseado em Sambrook & Russell. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. 3ª. ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. Capítulo 10, protocolo 1.

Tabela 5.4 – Relação entre o peso molecular da proteína e a concentração de gel adequado para análise.

Tamanho molecular da proteína (kDa)	Concentração de acrilamida (%)*
10 - 43	15
12 - 60	12
20 - 80	10
36 - 94	7,5
57 - 212	5,0

Fonte: Baseado em Sambrook e Russell. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Plainview – New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. Anexo A8.

*A razão molar de bisacrilamida:acrilamida é de 1:29.

A bisacrilamida é neurotóxica, já a acrilamida não. No entanto, esta última pode conter alguns monômeros não polimerizados capazes de apresentar neurotoxicidade. Dessa forma, ao manusear esses reagentes devem-se usar luvas, máscaras e em hipótese alguma colocar pipeta na boca.

Utilização de Diferentes Tampões durante a Separação Eletroforética

O deslocamento das proteínas através do gel de poliacrilamida depende da interação dos íons presentes nos tampões utilizados nos géis e nos reservatórios dos eletrodos quando submetidos a um campo elétrico. Nesse sentido, podemos utilizar sistemas tampão contínuo ou descontínuo.

Sistemas de eletroforese nos quais os mesmos íons do tampão estão presentes na amostra, no gel e nos reservatórios dos eletrodos (podendo ter concentrações diferentes) a um pH constante são referidos como sistema tampão contínuo. Por outro lado, no sistema descontínuo empregam-se tampões iônicos diferentes tanto na composição quanto no pH (Fig. 5.6).

Normalmente, opta-se por trabalhar com o sistema descontínuo por apresentar a possibilidade de aplicar

grandes quantidades de proteínas e obter melhor resolução. Nesse sistema empregam-se dois tipos de géis com tamanhos de poros diferentes. Inicialmente, tem-se uma camada de gel com porosidade maior, denominada gel de empilhamento, o que permite que a amostra seja agrupada. Já a separação efetiva ocorre em uma segunda camada de gel de porosidade menor, denominada gel de separação. Nas tabelas 5.5 e 5.6, apresentamos o protocolo para preparação de géis de diferentes concentrações.

Os íons comumente utilizados são a glicina presente no reservatório do eletrodo e o Tris-HCl nos géis de empilhamento e separação com pH 6,7 e 8,0, respectivamente. A escolha desses íons está baseada no seu comportamento quando submetidos a um campo elétrico. A glicina, sendo um ácido fraco, apresenta pequena mobilidade e dissociação iônica. Por outro lado, o cloreto presente no tampão Tris-HCl [(Hidrocloreto de Tris (hidroximetil) aminometano)] apresenta mobilidade e dissociação maior. Dentro do sistema de eletroforese descontínuo (Fig. 5.6) utiliza-se inicialmente uma voltagem baixa (70 Volts); nestas condições, a migração lenta dos íons da glicina e a rápida dos íons cloreto promovem o empilhamento da amostra.

Em seguida, aumenta-se a voltagem para 100 Volts promovendo um equilíbrio na velocidade de migração dos íons e a separação das proteínas em bandas definidas.

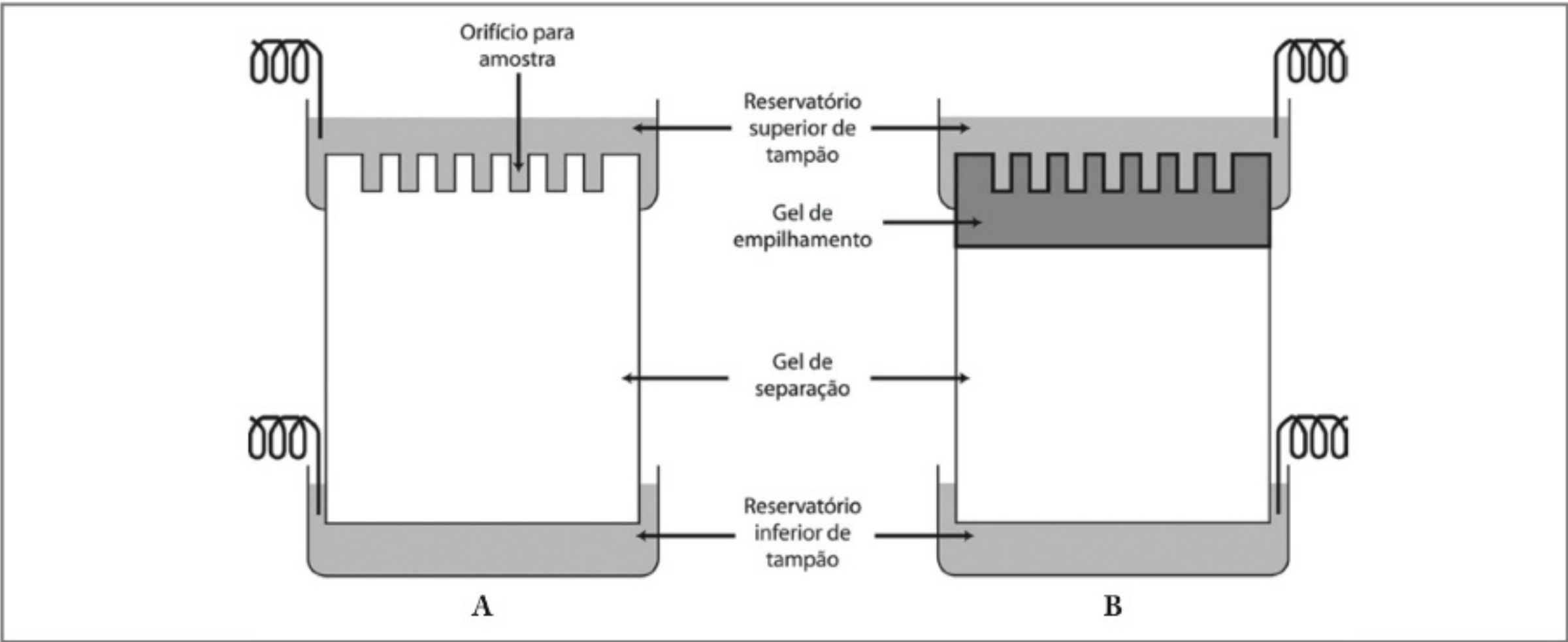


Figura 5.6 – Sistema tampão contínuo e descontínuo com géis em forma achatada. **(A)** Sistema de tampão contínuo usado em conjunto como gel em forma achatada; a amostra é colocada dentro dos orifícios formados diretamente no gel de separação. **(B)** Sistema tampão descontínuo usado em conjunto com géis em forma achatada; as amostras são colocadas dentro dos orifícios formados no gel de empilhamento.

Tabela 5.5 – Soluções e concentrações para o preparo de géis de separação para eletroforese tris-glicina-SDS-poliacrilamida.

Componentes da solução	Concentração de 6% Volume 5 mL	Concentração de 8% Volume 5 mL	Concentração de 10% Volume 5 mL	Concentração de 12% Volume 5 mL
Água	2,6	2,3	1,9	1,6
Mistura de acrilamida a 30% e 0,8% de bisacrilamida	1,0	1,3	1,7	2,0
Tris* 1,5 M (pH 8,8)	1,3	1,3	1,3	1,3
SDS** a 10%	0,05	0,05	0,05	0,05
Persulfato de amônio a 10%	0,05	0,05	0,05	0,05
TEMED***	0,005	0,003	0,002	0,002

Fonte: Baseado em Sanbrook e Russell. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Plainview – New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. Anexo A8. *Tris – tris-(hidroximetil) amino-metano; / **SDS- Sulfato de Sódio Dodecila; / ***TEMED – N,N,N',N' – tetrametiletilenodiamina.

Tabela 5.6 – Soluções para o preparo do gel de empilhamento para eletroforese Tris-glicina-SDS-poliacrilamida.

Componentes da solução	Concentração de 5% Volume 5 ml	Concentração de 15% Volume 5 ml
Água	3,4	1,1
Mistura de acrilamida a 30% e 0,8% de bisacrilamida	0,83	2,5
Tris 1,5 M (pH 6,8)	0,63	1,3
SDS a 10%	0,05	0,05
Persulfato de amônio a 10%	0,05	0,05
TEMED	0,005	0,002

Fonte: Baseado em Sanbrook e Russell. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. Plainview – New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. Anexo A8.

Referências

- Davis, L.G.; Kuehl, W.M.; Battey, J.F. DNA Restriction fragment analysis and preparation. In: Davis, L.G.; Kuehl, W.M.; Battey, J.F. *Basic Methods in Molecular Biology*. 2nd ed., Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut, 1994, pp. 146-152.
- Sanbrook; J. e Russell, D.N. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3º ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 Cap. 10, protocolo 1.
- Voet, D. Voet, J.G. *Biochemistry*. 2nd ed., New York, John Wiley, 1995, pp. 89-96.
- Westermeier, R. Electrophoresis. In: Westermeier, R. *Electrophoresis in Practice. A guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separation*. 2nd ed., V.C.H. Awiley Company, 1997, pp. 5-36.

6. Avaliação da Expressão de RNA Mensageiro por *Northern Blotting*

Gisele Giannocco
Rozangela Verlengia
Rosario Dominguez Crespo Hirata
Mário Hiroyuki Hirata

Introdução

O *Northern blotting* é uma técnica de biologia molecular que possibilita analisar perfil de expressão, tamanho e processamento alternativo de mRNA de genes expressos, utilizando RNA total ou mRNA purificado, obtidos a partir das mais variadas amostras biológicas. Esta técnica é similar à de transferência de DNA e foi desenvolvida por James Alwine e George Stark da Universidade de Stanford na Califórnia (Alwine et al., 1977).

O método de *Northern blotting* envolve cinco etapas: 1. obtenção de RNA total ou mensageiro; 2. separação eletroforética de RNA em gel de agarose em condições desnaturantes; 3. transferência de RNA do gel de agarose para a membrana de náilon; 4. hibridação de mRNA fixado na membrana com sondas marcadas (radioisótopos ou reagentes fluorescentes, quimioluminescentes, bioluminescentes ou colorimétricos); 5. detecção do sinal de hibridação; e 6. re-hibridação. Na figura 6.1, é apresentado o fluxograma das etapas envolvidas no desenvolvimento do método de *Northern blotting*.

A seguir, é apresentada uma descrição dos principais aspectos envolvendo cada etapa do *Northern blotting*. Os procedimentos apontados sobre a obtenção do RNA devem ser utilizados em quaisquer experimentos e procedimentos técnicos que envolvam sua análise.

Obtenção do RNA

Cuidados e Método de Extração de RNA

A obtenção do RNA representa o primeiro passo nas análises de detecção e expressão de genes. O cuidado principal a ser tomado no isolamento do RNA é a proteção contra a ação de ribonucleases (RNases) que estão presentes em todos os tipos celulares.

As RNases representam uma família de enzimas que degradam as moléculas de RNA por meio de atividades de endonuclease e exonuclease. São enzimas altamente estáveis devido as suas configurações terciárias estabilizadas por quatro pontes de dissulfeto e que permitem a reestruturação completa após o tratamento com agentes desnaturantes ou alta temperatura. Cofatores como adenosina trifosfato (ATP) e cloreto de magnésio (Mg^{2+}) estão envolvidos na função catalítica das RNases (Schoenberg e Cunningham, 1999) que, são ativas em uma ampla variedade de pH.

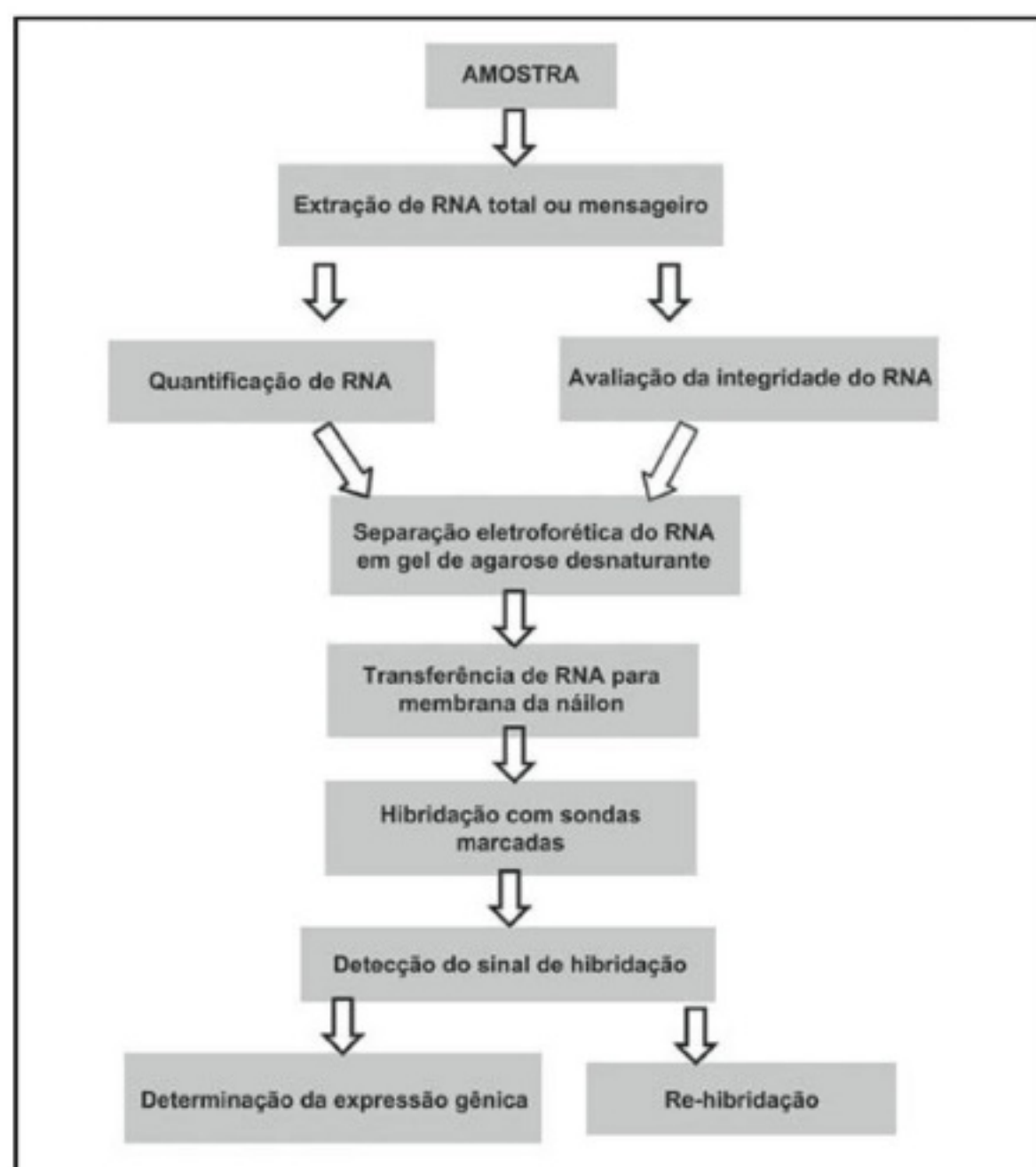


Figura 6.1 – Fluxograma representativo das etapas envolvidas no desenvolvimento do método de *Northern blotting*.

A atividade extrínseca das RNases refere-se a sua presença como contaminante em frascos de reagentes, soluções ou água, cubas de eletroforese, pipetas e dispensadores de volume e outros materiais. A principal fonte, entretanto, é a gordura dos dedos, que é rica em resíduos celulares que apresentam atividade de RNases.

A atividade intrínseca das RNases relaciona-se às enzimas liberadas na lise celular durante o procedimento de extração de RNA. Para proteger o RNA de degradação por RNases durante esse procedimento, é necessário utilizar inibidores de RNases.

Os cuidados no manuseio de vidrarias, material plástico, reagentes e outros utilizados na extração de RNA estão apresentados no quadro 6.1. Cabe ressaltar que o principal cuidado é a proteção do RNA utilizando-se inibidores de RNases, além dos cuidados usuais das boas práticas de laboratório de biologia molecular.

Os inibidores de RNases podem ser classificados em específicos e inespecíficos. Os inibidores específicos atuam em determinadas classes de RNases (RNase A, RNase B, RNase C, RNase T1), como os complexos vanadil-ribonucleosídeos (VDR, VRC).

Os inibidores inespecíficos atuam de forma ampla eliminando a atividade das RNases. O dietilpirocarbonato (DEPC) é o inibidor inespecífico mais eficiente e utilizado para o tratamento da água a ser usada no preparo de soluções, tampões e outros reagentes. Cuidados no seu manuseio devem ser tomados, pois é um produto com potencial tóxico. O DEPC pode ser adicionado a água, soluções, tampões e reagentes na concentração final de 0,05% a 0,1% (v/v). Os líquidos que contêm DEPC devem ser mantidos por algumas horas em uma plataforma orbital ou por 16 horas em agitador magnético. Em sequência, devem ser autoclavados para inativação completa do DEPC que se transforma em

Quadro 6.1 – Procedimentos e cuidados no manuseio de materiais e reagentes para a extração de RNA.

Materiais	Procedimentos e cuidados
Vidraria	A eliminação de RNases da vidraria faz-se por esterilização por calor seco em forno a 240-250°C durante 3 a 4 horas. A vidraria reutilizada deve ser reservada exclusivamente para o trabalho com RNA, não sendo permitido o uso nas demais áreas do laboratório
Material plástico	Ponteiras, tubos e outros materiais plásticos devem ser adquiridos já esterilizados, livres de RNases e ser sempre manuseados com luvas. A eliminação de RNases do material plástico não esterilizado pode ser realizada por autoclavação. Não reutilizar material
Água ultrapura e soluções e reagentes	A eliminação de RNases da água, soluções e reagentes se dá por meio do tratamento da água com inibidores de RNases inespecíficos. Seguido de sua inativação
Soluções de RNA	Adição de inibidores de RNases específicos
Unidades de eletroforese	Cubas, conjunto de bandejas, suportes de gel e pentes devem ser lavados com água tratada com DEPC. O material de acrílico sofre ação do DEPC não desativado e, portanto, não pode ser exposto diretamente a esse reagente
Equipamento de proteção individual (EPIs)	Maçanetas, micropipetadores, porta de refrigeradores e geladeiras representam uma fonte potencial de contaminação com RNases, dessa forma, luvas devem ser utilizadas e trocadas durante os experimentos, principalmente durante o procedimento de extração do RNA.
Superfícies não metálicas	A limpeza deve ser feita com hidróxido de sódio (NaOH) à 1N e na sequência ser removido com álcool etílico à 70%

dióxido de carbono (Rapley, 2000). Não deve ser observado o odor de DEPC após autoclavação, e quando isto ocorre indica que a autoclavação não foi eficiente. O DEPC pode ser inativado de tampões que não podem ser autoclavados por aquecimento a 60°C durante a noite. É importante eliminar completamente os traços de DEPC, uma vez que este composto pode modificar resíduos de adenina, isto é, provocar mutações, uma alteração que pode comprometer o uso do RNA nos procedimentos de transcrição *in vitro*.

Os tampões que contêm Tris (hidroximetil) amino-metano ou mercaptoetanol não podem ser tratados com DEPC devido a sua alta reatividade com estes. Nestes casos, deve-se utilizar água tratada com DEPC previamente autoclavada, seguindo-se outra etapa de autoclavação. Uma alternativa é filtrar as soluções que não podem ser preparadas com DEPC utilizando-se filtros de nitrocelulose para remover a RNase e outros traços de proteínas.

Vários métodos de isolamento de RNA foram publicados (Gilman, 1988; Sambrook et al., 1989; Kingston et al., 1991; Wilkinson, 1991; Chabot, 1993; Farrell, 1993; Chomczynski, 1993; Chomczynski e Sacchi, 2006). Os métodos mais eficazes e populares são os que utilizam tampões caotrópicos, tais como isotiocianato de guanidina e hidrocloreto de guanidina, para promover lise celular e principalmente pelo alto poder de destruição de RNases. O Trizol® e/ou Trizol Reagent (Invitrogen, Groningen, NL) representam a forma comercial do método desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987), no qual é empregado o isotiacianto de guanidina.

Quantificação do RNA

O RNA extraído deve ser quantificado para uniformizar as quantidades de RNA a serem utilizadas nos experimentos. A concentração e a pureza do ácido nucleico podem ser determinadas por espectrofotometria, no comprimento de onda de 260 nm, que representa a média da absorção máxima dos nucleotídeos individuais que variam entre 256 e 281 nm. Para estimar a concentração de uma solução de ácido nucleico, assume-se que 1 unidade de absorbância (A) em 260 nm equivale a 50 µg/mL de DNA nativo, 33 µg/mL de DNA fita simples e 40 µg/mL de RNA.

A quantificação direta em 260 nm fornece pouca informação sobre a qualidade e pureza das amostras de RNA. A presença de excesso de sal, conteúdo proteico (absorbância em $A_{280\text{nm}}$) e/ou contaminação com solventes orgânicos ($A_{320\text{nm}}$) podem promover distorção

significativa no valor de absorbância. Devido a este fato, o cálculo da razão A_{260}/A_{280} (razão 260:280) permite estimar a pureza das amostras. Amostras de RNA puras têm razões 260:280 de $2,00 \pm 0,05$.

Análise da Integridade do RNA

A integridade do ácido nucleico pode ser avaliada por separação eletroforética usando como matriz o gel de agarose (propriedades desse reagente ver Capítulo 5). Os ácidos nucleicos podem ser detectados após coloração com corantes que se intercalam entre bases nitrogenadas e tornam-se fluorescentes quando estimulados com a luz ultravioleta (por exemplo, brometo de etídio, ver Capítulo 4).

O RNA ribossômico (rRNA) é o tipo mais abundante de RNA (80-85%). Em gel de agarose, este material pode ser visualizado sob a forma de duas bandas bem distintas de 4.872 bp (28S) e 1.872 bp (18S) (Fig. 6.2), onde a banda 28S apresenta cerca de duas vezes a intensidade da banda 18S. Estas características evidenciam a integridade da amostra de RNA total extraído.

Quando se aplica mais que 10 µg de RNA total em gel de agarose, é possível visualizar RNAs de menor tamanho, como rRNA (5S) e tRNAs. Os mRNAs não são visualizados nestas condições devido a sua baixa concentração (menos de 4%). O mRNA obtido por métodos de captura com oligo (dT) pode ser visualizado quando se aplica mais que 2 µg no gel; o perfil de arraste, que se estende a partir do local de aplicação observado, corresponde ao mRNA, como resultado da natureza extremamente heterogênea das moléculas de mRNA.

Uma melhor separação eletroforética das moléculas de RNA é obtida sob condições desnaturantes, devido ao fato de impedirem a formação de estruturas secundárias (complementariedade entre as bases nitrogenadas) da fita simples de RNA (detalhes ver Capítulo 2).

Northern Blotting

Nos procedimentos de *Northern Blotting*, o RNA é separado em gel de eletroforese em condições desnaturantes para ser posteriormente fixado (*blotted*) em uma matriz sólida e hibridado.

Os desnaturantes mais comumente utilizados na eletroforese de RNA em gel de agarose são: formaldeído, glioxal e dimetil sulfoxido (DMSO). O hidróxido metilmercúrico é um desnaturante eficiente porém pouco utilizado devido a sua alta toxicidade. Para géis de poliacrilamida, a formamida e a ureia são os agentes

desnaturantes empregados. O formaldeído é o desnaturante de RNA mais utilizado, porém, por ser considerado um agente hepatocarcinogênico, deve ser manipulado em cabine de segurança química.

O formaldeído e a formamida são empregados durante o processo de desnaturação das amostras de RNA, de modo a garantir que as moléculas de RNA migrem ao longo do gel, de acordo com o peso molecular. Géis com formaldeído são menos rígidos do que outros géis de agarose e são consideravelmente mais escorregadios. Assim, cuidados devem ser tomados no momento de transferi-lo de um recipiente para outro.

Um balanço ótimo entre resolução eletroforética e eficiência de transferência a partir do gel é alcançado com gel de agarose desnaturante na concentração de 1,0-1,2% (Farrell, 1993). A eletroforese é comumente realizada em voltagem de aproximadamente 60 V para gel de 14 cm de comprimento (4V/cm) (Krieg, 1996).

Transferência de RNA para Membrana de Náilon

A etapa-chave na técnica de *Northern blotting* é a transferência dos RNAs separados no gel para uma membrana de filtro para subsequente fixação e hibridação com sonda ou sondas específicas.

As primeiras membranas a serem usadas foram as de nitrocelulose, porém foram substituídas por membranas de náilon por apresentar maior resistência à tensão, favorecendo o manuseio e as hibridações repetidas

com diferentes sondas. De acordo com a carga química da superfície da membrana, podem ser classificadas em neutras e positivas. As membranas de náilon (+) têm carga positiva líquida devido à presença de aminas na superfície. As membranas neutras apresentam uma capacidade de ligação do ácido nucleico de aproximadamente 100 µg/cm², e as de náilon (+), ao redor de 400-500 µg/cm², quando comparadas com as de nitrocelulose.

A transferência de RNA do gel desnaturante para a membrana de náilon pode ser realizada de várias formas, tais como: por capilaridade, alcalina, por pressão positiva e sistema de transferência a vácuo (Dunbar, 1994).

A **transferência por capilaridade** é o método mais frequentemente empregado devido ao baixo custo. O sistema é composto de uma cuba de vidro ou um recipiente no qual é colocado tampão de transferência SSC (solução de cloreto de sódio e citrato de sódio concentrado 10×). A cuba tem um suporte central, no qual se coloca uma tira de papel de filtro ou uma esponja com as extremidades em contato com o tampão. Em sequência, o gel é depositado sobre o papel de filtro ou a esponja, com a superfície de aplicação voltada para cima. Sobre o gel é depositada uma membrana de náilon, sobreposta por duas folhas de papel de filtro (de tamanho similar à área do gel). Na sequência, é colocada uma pilha de papel absorvente de dimensões semelhantes ao gel, uma placa de acrílico, na qual se deposita um peso de aproximadamente 200g. Este processo baseia-se no fluxo por capilaridade da solução de cloreto de sódio e citrato de sódio (SSC) entre os vários sistemas de absorção (esponja e/ou papel de filtro e papel absorvente) do sanduíche montado e tem a duração de 12 a 14h. Neste processo, as moléculas de RNA presentes no gel desnaturante são carregadas e ligam-se à membrana de náilon (Fig. 6.3).

Após a transferência, a membrana é removida e lavada em solução SSC concentrada 6×. O RNA é fixado à membrana por aquecimento a 80°C, por 1 h em estufa de aquecimento (Farrell, 1993) ou por *cross-linking* em forno ultravioleta. A energia ultravioleta de curta intensidade (254 nm) ativa as bases nitrogenadas timina e uracila (e outras bases nitrogenadas em menor grau), que se tornam altamente reativas e formam ligações covalentes com superfícies que contêm aminas das membranas náilon (+) (Saito et al., 1981). As membranas de náilon úmidas geralmente requerem uma exposição total de 1,6 kJ/m² e as secas ao ar a exposição a 160 J/m² é suficiente (Church e Gilbert, 1984).

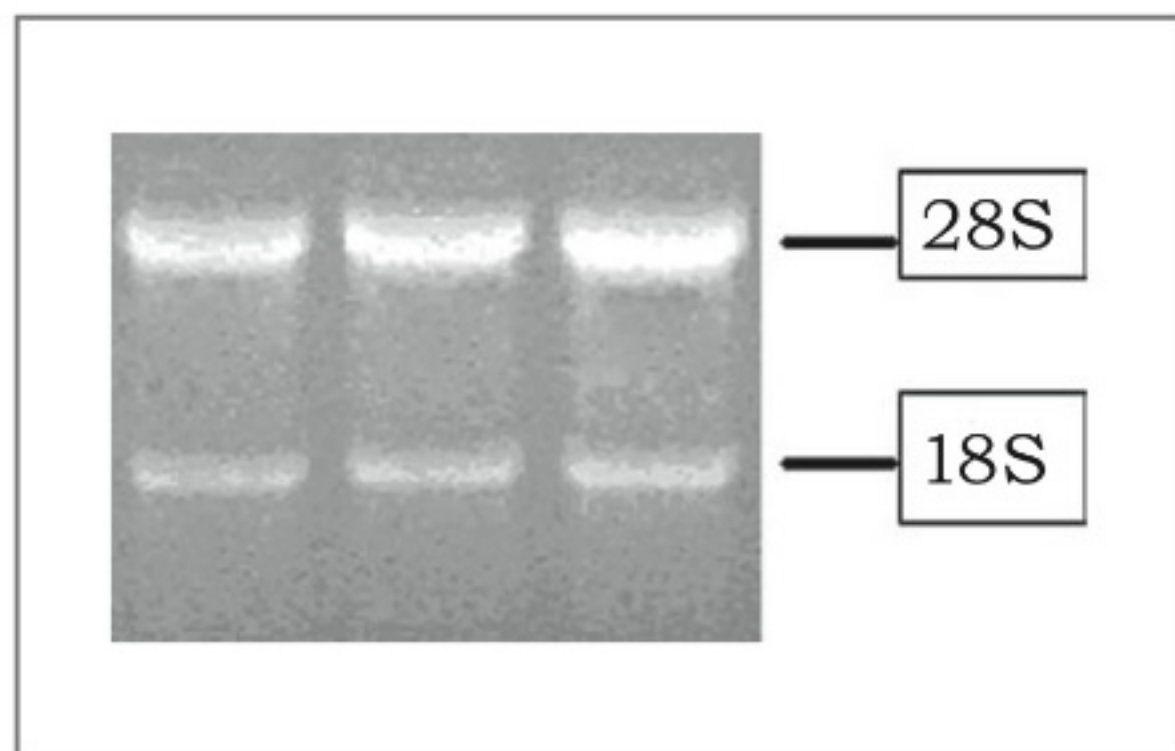


Figura 6.2 – Separação eletroforética de RNA total de tecido muscular estriado de rato em gel de agarose a 1,2% com formaldeído 0,66 M. A forma definida das espécies de rRNA 28S e 18S indicam a integridade da amostra de RNA total (cortesia da Dra. Rozangela Verlengia).

Hibridização com Sondas Marcadas

Pré-hibridação

A detecção e/ou a quantificação do RNA de interesse faz-se por meio da hibridação entre a sonda nucleotídica marcada e as sequências-alvo fixadas na membrana de náilon. As sondas nucleotídicas são fragmentos de DNA ou RNA (20 a 500 bp de comprimento, esse tamanho depende do tipo de marcação) que podem hibridizar-se a uma sequência complementar de DNA ou RNA que se deseja investigar.

A hibridação envolve principalmente três etapas, denominadas pré-hibridação, hibridação e lavagem pós-hibridação.

Na pré-hibridação, a membrana é colocada em um frasco de hibridação, mais comumente usado, e/ou em uma embalagem plástica, similar a um saco plástico muito resistente. Posteriormente, é acrescentada a solução de pré-hibridação para equilibrar a membrana com o tampão no qual o processo de hibridação vai ocorrer e promover o bloqueio da membrana. No processo de bloqueio, a superfície da membrana com RNA fixado é preenchida com fragmentos de DNA heterólogo desnaturado (sem relação com o RNA a ser investigado). Usualmente, é utilizado o DNA de

esperma de salmão ou de timo de bezerro. Com isso, evita-se que a sonda se ligue à membrana e gere sinal de fundo (*background*) que pode alterar os resultados. A pré-hibridação é realizada por 2-4h, a 42°C, sob rotação/homogeneização constante. Outro aspecto importante é a viscosidade do tampão de hibridação. A taxa de hibridação da sonda é aumentada com o aumento da viscosidade, o que é possível com a adição de polímeros inertes. Por exemplo, a presença de 10% de sulfato de dextrano aumenta em até 10× a taxa de reassociação. O efeito é atribuído à exclusão do DNA a partir do volume ocupado pelo polímero, efetivamente aumentando a concentração do DNA. Neste caso, a viscosidade é obtida pela adição de sulfato de dextrano (polímero aniônico) ou solução de Denhardt (Quadro 6.2). A solução de Denhardt é constituída de 1 g de Ficoll® 400, 1 g de polivinilpirrolidona, 1 g de BSA fração V (q.s.p 500 mL), filtrado e estocado a -20°C e é mais eficiente que o sulfato de dextrano por evitar o aparecimento de sinal de fundo na membrana.

Outro reagente presente na solução de pré-hibridação é a formamida que reduz a temperatura de desnaturação (*melting*, T_m) e consequentemente, a de hibridação de cerca de 0,75°C a cada 1% de formamida adicionada para poli(dA:dT) e de 0,5°C para poli(dG:dC). Uma das vantagens do uso da formamida é que as sondas

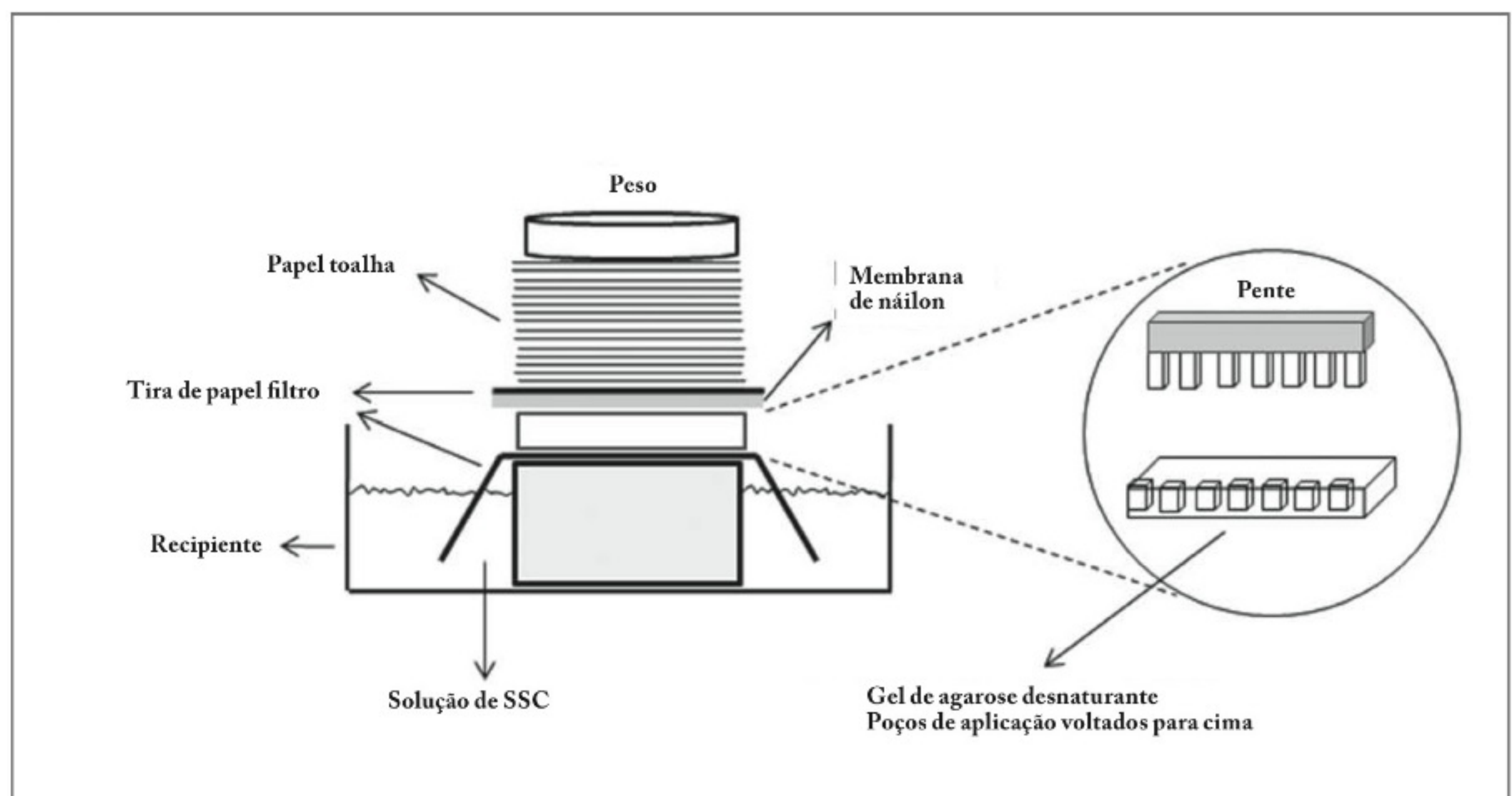


Figura 6.3 – Esquema representativo do processo completo de transferência de RNA do gel de agarose desnaturante para a membrana de náilon por capilaridade. O papel absorvente e o peso sobre a superfície promovem a formação do fluxo do tampão em direção ao topo do papel-toalha absorvente.

são mais estáveis a baixas temperaturas o que por outro lado, melhora a retenção do ácido nucleico sobre as membranas (Anderson e Young, 1985).

Hibridação

A etapa de hibridação ocorre pela adição da sonda marcada (para marcação de sondas ver Capítulo 3). Para que possa hibridar, a sonda deve ser previamente linearizada por desnaturação em pH alcalino ou a alta temperatura. A desnaturação pode ser realizada pela adição de 0,1 volume de (NaOH) 1N à sonda (que usualmente está em um volume de 50-100 μ L), seguida de incubação a 37°C durante 10 minutos ou à temperatura ambiente. Então a sonda pode ser adicionada diretamente à solução de hibridação, sem ser neutralizada, uma vez que o volume é inferior a 150 μ L. Muitos laboratórios optam por desnaturar as sondas por aquecimento seguido de resfriamento em gelo, porém cuidados devem ser observados quanto ao manuseio de material radiativo. As sondas marcadas com isótopos radiativos são desnaturadas a temperaturas inferiores a 90°C para evitar a formação de vapor radiativo (ver Capítulo 3). A hibridação se dá por um período de 12-16 horas (*overnight*) a 42°C, também sob agitação constante. Vale a pena salientar que existem vários protocolos de hibridação com diferentes soluções e temperaturas (neste capítulo estão descritos os mais utilizados).

Assim, em condições de reações bem controladas, as sondas desnaturadas hibridizam com as sequências complementares de RNA imobilizado na membrana. Em seguida, as moléculas de sonda não hibridadas são removidas pela lavagem das membranas utilizando soluções com baixa concentração de sal e, em geral, utiliza-se a mesma solução da etapa de transferência (Maniatis et al., 1989; Rapley, 2000).

No *Northern blotting* e em outros métodos de hibridação, a eficiência e a especificidade são parâmetros importantes porque estão diretamente relacionados com a qualidade dos resultados a serem obtidos. A eficiência está relacionada com a capacidade de pareamento entre o mRNA e a sonda, e a especificidade permite discriminar moléculas com alto grau de complementariedade daquelas que o têm baixo. Nesse aspecto, as condições de estrigência, definidas como um conjunto de condições (pH, temperatura, concentração iônica) que interferem na associação das fitas de ácidos nucleicos, podem induzir resultados negativos ou falso-negativos.

Condições de alta estrigência favorecem a hibridação somente entre as moléculas de ácido nucleico que têm alto grau de complementariedade. Quando a estrigência é baixa, uma proporção aumentada de hibridação inespecífica pode ocorrer.

No quadro 6.2, são indicados os fatores associados com altas ou baixas estrigências, tais como concentração iônica, pH e temperatura. A formação do heteroduplex (RNA: sonda de DNA) é promovida em meio de baixa estrigência, enquanto a dissociação em fitas simples é favorecida quando a estrigência é aumentada.

Deteção do Sinal de Hibridação

A detecção do sinal de hibridação depende do tipo de molécula sinalizadora que se encontra acoplada aos nucleotídeos que constituem a sonda (para mais detalhes ver o Capítulo 3). Para as sondas marcadas com radioisótopos, principalmente com fósforo-32 (32 P) e/ou fósforo 33- (33 P), a detecção faz-se por autorradiografia com exposição da membrana a filme de raios X ou écran de fosforoimagem. Quando as moléculas sinalizadoras estão marcadas com moléculas não radiativas (biotina, digoxigenina, enzimas), estas podem ser detectadas por método colorimétrico, quimioluminescente, ou fluorescente, dependendo do substrato empregado. As técnicas de fluorescência são menos usadas para a análise de ácidos nucleicos sob suporte de membranas, uma vez a detecção e a análise do sinal requerem equipamentos especiais.

Alguns cuidados devem ser tomados para manter as condições adequadas de detecção do sinal de hibridação, tais como: 1. evitar a secagem da membrana, especialmente quando a detecção do sinal é quimioluminescente; 2. para método detecção não isotópico, a membrana hibridada deve ser lavada e processada de acordo com a recomendação do fabricante; 3. para método de detecção com radioisótopo, a membrana deve ser embalada em papel plástico fino e transparente antes da autorradiografia.

Determinação da Expressão Gênica

A quantificação da expressão gênica é realizada por meio de medida de densidade óptica (DO) do sinal emitido pela sonda hibridada ao RNA na membrana. Para essa medida, são utilizados programas de informática que permitem a captura e análise de imagem. A expressão gênica é uma medida relativa entre o sinal do gene de interesse e o do gene de referência, também denominado gene constitutivo (*house keeping*). Os genes constitutivos

Quadro 6.2 – Fatores que influenciam a eficiência de hibridação no Northern blotting.

Fatores	Baixa estringência	Alta estringência
Sal (NaCl)	Alta concentração	Baixa concentração
pH	Levemente ácido	Alcalino
Temperatura	Baixa	Alta
Eficiência de hibridação	Aumenta	Diminui

Fonte: Farrell, R.E. Jr. RNA methodologies. In *Laboratory Guide for Isolation and Characterization*, Farrell R.E. Jr. (ed.). San Diego, CA: Academic Press, pp 47-91, 1993.

representam um conjunto de genes que são expressos de forma continuada na célula, teoricamente sem sofrerem a interferência de fatores exógenos. Contudo, é sempre necessário verificar qual é o melhor gene a ser considerado constitutivo para cada sistema de interesse. Neste caso, a quantificação é denominada semiquantitativa.

Re-hibridação

Após a captura do sinal de hibridação do gene de interesse, é possível re-hibridar a membrana com outra sonda de interesse, por exemplo com o gene constitutivo. Para tanto, é necessário lavar a membrana para remover totalmente a sonda previamente hibridada e então submetê-la a uma nova hibridação com outra sonda. O tampão empregado na etapa de lavagem apresenta alta estringência que favorece a dissociação do heterodúplex RNA: sonda. É importante mencionar que a estringência é função da força iônica, temperatura e tempo; portanto, não é adequado diminuir o tempo de lavagem aumentando a estringência da solução de lavagem.

Procedimento Experimental

O protocolo do procedimento experimental de *Northern blotting* é descrito a seguir:

Material Necessário

Equipamentos

- Agitador de bancada tipo orbital
- Agitador magnético
- Agitador de tubos
- Centrífuga refrigerada
- Congeladores -20°C e -80°C
- Cuba de eletroforese horizontal

- Fonte de eletroforese
- Forno de hibridação
- Forno micro-ondas
- Homogeneizador de tecidos
- pHmetro
- Pipetas automáticas nos volumes de: 0,5 a 10 μL ; 10 a 100 μL , 50 a 200 μL ; 100 a 1.000 μL
- Ponteiras com e sem filtro nos volumes de: 0,5 a 10 μL ; 10 a 100 μL , 50 a 200 μL ; 100 a 1.000 μL
- Refrigerador
- Sistema de fotodocumentação
- Transiluminador

Reagentes, Material Plástico e Vidraria

Nota: Todos os reagentes devem necessariamente ter grau de Biologia Molecular.

- Acetato de sódio
- Ácido bórico
- Ácido etilenodiaminotetracético (ETDA)
- Ácido 3-(3-morfolino) (N-morfolino)-propano sulfônico (MOPS).
- Agarose ultrapura
- Álcool isoamílico
- Álcool isopropílico
- Azul de metileno
- Brometo de etídio
- Citrato de sódio
- Cloreto de sódio
- Clorofórmio
- Corante azul de bromofenol

- Dietilpirocarbonato (DEPC)
- DNA de espermatozoides de salmão desnaturado
- Sulfato de sódio dodecila (SDS)
- Enzima do fragmento Klenow
- Etanol
- Fenol
- Formaldeído
- Formamida
- Hidróxido de sódio (NaOH)
- Kit de marcação de sonda com radioisótopos
- Luvas de látex
- Membrana de náilon carregada positivamente
- Papel de filtro ou equivalente
- Marcador de tamanho molecular de RNA (0,24-9,5 kb)
- Solução de Denhardt's (Ficoll 400, BSA e PUP-360)
- Tris (hidroximetil) aminometano (Tris-Base)
- Trizol® (Invitrogen, Groningen, NL) – reagente para extração de RNA total
- Tubos de plástico de 1,5 e 2,0 mL
- Vidraria: béquer, erlenmeyer, proveta, bastão, outros.

Extração de RNA Total

A seguir tem-se a descrição da extração do RNA total utilizando *kit* comercial (Quadro 6.3).

Lise Celular

1. Transferir o meio de cultura contendo $5-10 \times 10^6$ células para um tubo de 1,5 ou 15 mL, centrifugar por 5 min a 1.000 (revoluções por minuto – rpm) e remover o sobrenadante.
2. Adicionar 1 mL do reagente de lise (Trizol®) às células, homogeneizando com uma pipeta por várias vezes.

Para os tecidos: homogeneizar 0,1 g de tecido acrescido de 1 mL do reagente de lise (Trizol®) durante 15 s a 30.000 rpm utilizando um homogeneizador.

3. Incubar os homogenatos por 5 min a 25°C (temperatura ambiente).

Purificação do RNA

1. Adicionar 0,2 mL de clorofórmio e fechar bem o tubo. Agitar os tubos vigorosamente por 15 s e incubar a 25°C por 10 min.
2. Centrifugar a $12.000 \times g$ por 15 min, a 2-4°C. Nesta etapa são formadas três fases: superior (aquosa), inferior (fenol:clorofórmio) e intermediária (proteínas desnaturadas).

Precipitação do RNA

1. Transferir a fase aquosa para outro tubo de 1,5 mL (tomar muito cuidado para aspirar a fase aquosa e não contaminá-la com as outras fases; caso isso ocorra, é necessário centrifugar a amostra novamente).
2. Adicionar 0,5 mL de isopropanol. Incubar por 10 min a 25°C e centrifugar a $12.000 \times g$ por 10 min, a 2-4°C.

Modificação – nos casos de amostras com pouca quantidade de RNA, adicionar glicogênio (10 µg) e manter em congelador a -70°C por 1 h. O glicogênio atua como carreador, aumentando a quantidade de RNA total a ser recuperada.

Remoção de Sais

1. Remover o sobrenadante e adicionar 1 mL de etanol a 75% gelado.
2. Homogeneizar por inversão e centrifugar a $12.000 \times g$, por 5 min a 4°C.
3. Remover completamente o sobrenadante tomando cuidado para não perder o precipitado que contém o RNA.
4. Inverter o tubo na bancada durante 15 min para permitir a evaporação do etanol. O uso de centrífuga a vácuo (*speed-vac*) para esta fase dificulta a dissolução do RNA e, portanto, deve ser evitado.

Dissolução do RNA

1. Dissolver o RNA com 50 µL de água tratada com DEPC, passando a solução no agitador de tubos e incubar por 15 min a 65°C.
2. Manter os tubos com RNA em gelo enquanto são preparadas alíquotas (a quantidade preparada depende da expressão do gene de interesse no tecido estudado). Armazenar as alíquotas a -80°C até o momento do uso.

Nota: O volume de água tratada com DEPC adicionado depende da concentração de RNA existente.

Quantificação do RNA

1. Diluir o RNA em água tratada com DEPC (diluir ou não o RNA dependerá do equipamento utilizado).
2. Calcular a concentração de RNA, multiplicando o valor de absorbância a 260 nm por 40 (coeficiente de concentração de RNA – 1 OD = 40 µg/mL) e pela diluição realizada. (Lembrar que muitos aparelhos já calculam a concentração do RNA por cada µL).

Análise da Integridade de RNA

1. Preparar um gel de agarose a 1,2% com tampão MOPS 1× em um volume final de 40 mL (quadro 4). Aplicar 2 µg do RNA extraído, adicionado de tampão de amostra para RNA 1× (As amostras de RNA são submetidas a desnaturação por solução contendo formaldeído (17,5%), formamida deionizada (50%), MOPS 10× (5%) e água tratada com DEPC, sob aquecimento (65°C). Receberam, então, solução contendo azul de bromofenol (50% de glicerol, 1 mM de EDTA, 0,4% de azul de bromofenol), para permitir a avaliação da progressão das amostras e reconhecer o fim da eletroforese. Adicionar 10 µL do tampão da amostra para cada 10 µg de RNA. Nota: é importante considerar que esta técnica requer grandes quantidades de RNA total (10 a 20 µg).

2. Submeter à separação eletroforética, 100 Volts durante 45 min para minigéis (4V/ cm de gel).

Desionização da Formamida

1. Em um béquer adicionar 50 mL de formamida grau biologia molecular e 5 g de resina (MIXED BED RESIN – Sigma M-8032).
2. Homogeneizar em agitador magnético durante 30 min à temperatura ambiente.
3. Filtrar duas vezes utilizando papel de filtro Whatman nº 1. Aliquotar em volume de 1 e 10 mL e armazenar a menos -20°C.

Avaliação dos Resultados

1. Remover o gel de agarose desnaturante da cuba de eletroforese e colocá-lo sobre o transiluminador.
- Nota: Revestir o transiluminador com filme de PVC para evitar a contaminação do equipamento com resíduos tóxicos presentes no gel.
2. Amostras de RNA íntegras apresentarão duas bandas correspondentes às subunidades de RNA ribossômico (18 e 28 S, que correspondem, respectivamente, 1,8-2,0 e 4,6-5,2 kb). A intensidade do rRNA 28S é o dobro ao do rRNA 18S (Fig. 6.2).

Nota: Quando observar que as amostras ao separarem eletroforéticamente deixaram um rastro ao longo do

Quadro 6.3 – Preparo das soluções empregadas na fase de obtenção do RNA total.

Soluções	Preparo	Observações
Trizol® – reagente de extração de RNA total	Adquirido comercialmente	Deve ser mantido a 4°C em geladeira
Isopropanol	Adquirido comercialmente	Deve ser mantido em geladeira para o uso
Etanol a 75%	Etanol a 75% diluído em água isenta de RNases	É utilizado para a remoção de sais presentes no precipitado de RNA. Manter a -20°C
Água ultrapura isenta de RNases	Tratar a água ultrapura com 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC)	O tratamento deve ser realizado por 16 h. Requer autoclavação posterior para eliminar os resíduos de DEPC
Todas as soluções devem ser preparadas com água ultrapura isenta de RNases (água ultrapura tratada com DEPC ou adquirida comercialmente).		

gel, denominado de *arraste* é indicativo de que houve degradação da amostra extraída. Também não deve ser observada uma região clara no local do poço onde o RNA foi aplicado. Caso isso aconteça é indicativo da presença de DNA genômico.

Separação Eletroforética do RNA para Northern Blotting

1. Preparar o gel de agarose a 1,2% desnaturante (40 mL), como descrito no quadro 6.4, e vertê-lo em cuba isenta de RNases. Vale a pena comentar que o

volume a ser preparado de gel dependerá do tamanho da cuba, no quadro 4 temos uma sugestão para um gel nas proporções de 8,4 cm × 7,1 cm × 2,1 cm. Adicionar aproximadamente 300 mL do tampão MOPS concentrado 1×.

2. Preparar as amostras de RNA e adicionar o tampão de amostra, conforme descrito no quadro 6.4.

3. Aquecer durante 15 min a 65°C para a desnaturação das amostras e após esse período colocar em banho de gelo. Adicionar 1 mL de brometo de etídio (1mg/mL) e aplicar as amostras nos orifícios do gel.

Quadro 6.4 – Preparo das soluções usadas na separação eletroforética do RNA.

Soluções	Preparo	Observações
Tampão MOPS concentrado 10×	Preparar uma solução 10× concentrada contendo: MOPS a 0,2 M, pH 7,0; acetato de sódio a 50 mM, EDTA a 10 mM, pH 8,0	É utilizado para preparo do gel e separação eletroforética de RNA. Deve ser esterilizado por autoclavagem. Quando autoclavado, deve adquirir cor amarelo-ouro
EDTA a 0,5 M – pH 8,0	Pesar 9,305 g de EDTA e adicionar 50 mL de água ultrapura. Colocar em um agitador magnético e acrescentar pastilhas de NaOH vagarosamente, até a dissolução completa do sal, que deve ocorrer em pH próximo de 8,0	É utilizado na formulação de outras soluções
Gel de agarose desnaturante	Para 40 mL de gel, utilizar 0,4 de agarose, 4 mL de MOPS concentrada 10×, 1,6 mL de formaldeído e 34 mL de água ultrapura tratada com DEPC	Colocar a agarose em água tratada com DEPC e dissolver por aquecimento em microondas. Esfriar próximo de 55°C e adicionar o MOPS concentrado 10× e o formaldeído
Tampão da amostra para RNA (com formaldeído)	0,15 mL de MOPS concentrado 10× 0,24 mL de formaldeído 0,75 mL de formamida 0,1 mL de água ultrapura isenta de RNase 0,1 mL de glicerol 0,008 mL azul de bromofenol	Esta solução é adicionada à amostra de RNA para ser aplicada no gel, confere densidade às amostras e indica a migração das amostras no gel. Colocar 0,001 mL do tampão por 10 µg de RNA liofilizado
Formamida desionizada	Adquirida comercialmente – se não estiver desionizada é necessário proceder conforme descrito no item desionizando a formamida	É um reagente desnaturante, permite que as fitas de ácidos nucleicos fiquem linearizadas e ainda que as duplas fitas de ácidos nucleicos sejam desnaturadas
Formaldeído	É usado rotineiramente como solução estoque a 37% (12,3 M)	O formaldeído é um reagente desnaturante. É oxidado em contato com o ar. Desse modo, o pH do formaldeído deve ser verificado antes do uso, especialmente quando estocado por muito tempo. Se necessário, desionizar em pH neutro utilizando resina, conforme descrito para a formamida

Transferência de RNA do Gel para a Membrana de Náilon

Transferência por Capilaridade

1. Ao término da separação eletroforética, transferir o gel para uma cuba de vidro livre de RNases e lavá-lo duas vezes durante 15 min, sob agitação com água ultrapura tratada com DEPC.
2. Em seguida, adicionar 500 mL de solução de SSC concentrada 10× e manter sob agitação por 30 min (Quadro 6.5).
3. Em cuba com um suporte central colocar SSC concentrada 20× e uma tira de papel de filtro, de modo que as pontas da tira sejam submersas no tampão.
4. Depositar o gel sobre o papel de filtro, evitando a formação de bolhas.
5. Colocar tiras de filme de PVC sobre as extremidades do gel deixando exposta a parte deste onde se encontra o RNA (aplicação até o final da corrida eletroforética). Esse procedimento evita que o tampão se espalhe ao redor do gel, mas que passe através dele.
6. Cortar a membrana de náilon no tamanho exato da superfície do gel exposto.

Nota: A membrana deve ser previamente embebida na solução de SSC concentrada 20× por 10 min.

7. Colocar a membrana sobre a superfície do gel evitando a formação de bolhas.

Nota: Caso tenha bolhas, remover utilizando um bastão de vidro, o qual deve deslizar suavemente sobre a membrana.

8. Umedecer novamente a membrana de náilon com a solução de SSC concentrada 20×.
9. Colocar dois papéis de filtro sobre a membrana e várias toalhas de papel sobre o papel de filtro. Por último, colocar uma placa de vidro e um peso equivalente a 200 g. Pode-se utilizar uma garrafa com água como peso para processo de transferência por capilaridade.
10. Deixar transferindo durante 18 horas. Em seguida, desmontar o sistema de transferência e avaliar a eficiência da transferência.

Avaliação da Eficiência da Transferência

1. Colocar a membrana em 20 mL de solução de azul de metileno durante 3 min e descorar em água durante 10 min (Quadro 6.6). Em paralelo a este procedimento, o gel deve ser corado com brometo de etídio.
2. É possível observar a presença das bandas 28S e 18S na membrana, enquanto no gel não deverá ser observada a presença de fragmentos de RNA.

Quadro 6.5 – Preparo das soluções de transferência.

Solução de cloreto de sódio e citrato de sódio (SSC) concentrada 20×	3 M de cloreto de sódio e 0,3 M de citrato de tri-sódio • 2H ₂ O. Ajustar o pH para 7,0 com HCl 1 M	É utilizada para remover as ligações inespecíficas da sonda
Suporte sólido	Membrana de náilon carregada positivamente é adquirida comercialmente	É utilizada para a mobilização do ácido nucleico. Manusear sempre com luvas

Quadro 6.6 – Preparo da solução de análise da eficiência de transferência de RNA.

Azul de metileno	0,02% de azul de metileno e 0,3 M de acetato de sódio e ajustar o pH para 5,2
------------------	---

Fixação do RNA Transferido na Membrana

1. Colocar a membrana sob um papel de filtro e levar para um estufa com temperatura de 80°C por 2 h. Uma vez imobilizado o RNA, a membrana pode ser processada imediatamente ou mantida em local seco à temperatura ambiente até o momento do uso.

Pré-hibridização e Hibridização

Preparo da Sonda Marcada com Radioisótopo

Nota: deve-se observar todas as medidas de segurança para o manuseio com material radiativo.

Marcação radioativa – encontraram-se disponíveis comercialmente diferentes *kits* pela marcação radioativa. Seguir cuidadosamente as instruções do fabricante. Abaixo um resumo das principais etapas envolvidas, utilizando o 32 PATP.

1. Colocar fragmento de DNA (sonda) em banho de água fervente.
2. Aquecer por fervura durante 2 a 3 min e colocar a sonda imediatamente em gelo.
3. Adicionar os dNTPs (dCTP, dGTP, dTTP) (0,5 mM), α - 32 PdATP (3000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ L) e 1 a enzima do fragmento de Klenow. Homogeneizar vagarosamente e centrifugar a 1.000 \times g por 10s.
4. Incubar durante 3 h a 25°C e adicionar 5 μ L do tampão de término (EDTA 0,2 M).

Pré-hibridação e Hibridação

1. Embeber a membrana contendo o RNA imobilizado em solução de SSC concentrada 6 \times .
2. Transferir a membrana para o recipiente de hibridação (garrafas de hibridação) e colocar no forno de hibridação.
3. Adicionar a solução de pré-hibridação (ver Quadros 6.7 e 6.8) e incubar a uma rotação de 6 rpm durante 2 h a 42°C.
4. Pipetar o volume desejado da sonda desnaturada na solução de pré-hibridação e prosseguir com a incubação por 18 h sob agitação.

Lavagem da Membrana Pós-hibridação e Detecção do Sinal

A etapa de lavagem da membrana tem por objetivo remover as ligações inespecíficas da sonda ocorridas durante o processo de hibridação.

1. Retirar a solução de hibridação, colocando-a em local adequado para o descarte do radiativo.
2. Adicionar 80 mL da SSC concentrada 2 \times com SDS a 0,1%.
3. Incubar durante 10 min sob rotação de 10 rpm em temperatura ambiente.
4. Trocar a solução de lavagem pela mesma concentração da lavagem anterior e repetir o processo.
5. Substituir a solução de lavagem por um igual volume de solução de SSC concentrada 0,2 \times / SDS a 0,1%. Incubar durante 5 min sob a mesma rotação à temperatura ambiente. Repetir este procedimento mais uma vez.
6. Remover a solução de lavagem final e lavar a membrana novamente com SSC concentrada 2 \times à temperatura ambiente.
7. Envolver o filtro em filme de PVC, selar, e expor o filme de raios X por 16 a 24 h -70°C.

Um esquema da separação eletroforética do RNA total de músculo cardíaco de ratos está representado na (Fig. 6.4). É possível observar o padrão de peso molecular de RNA (Fig. 6.4, linha 1) e o padrão de migração dos genes da β -actina e da mioglobina, com peso molecular de 1,7 kb e 0,9 kb, respectivamente (Fig. 6.4A). Na figura 6.4B, está representado o perfil autorradiográfico destes genes após a hibridação da membrana, inicialmente com a sonda específica para reconhecimento da mioglobina e, na sequência re-hibridada com a sonda da β -actina, ambas as sondas são marcadas com 32 P dCTP. Após a análise densitométrica da expressão da mioglobina em unidades arbitrárias, seus valores podem ser normalizados pelos valores obtidos a partir da banda da β -actina (Mb/ β -actina), obtendo-se, dessa forma, o valor semiquantitativo da expressão da mioglobina.

Quadro 6.7 – Componentes da solução de pré-hibridação e hibridação*.

DNA de espermatozoides de salmão	50 µg/5 mL de solução de pré-hibridação*	É usado para evitar ligações inespecíficas da sonda com a membrana
Solução de Denhardt concentrado 100×	Pode ser adquirida comercialmente ou preparada: 2 g de Ficoll 400 2 g de PVP-360 2 g de BSA 100 mL água tratada com DEPC Esterilizar por filtração	Aumenta a viscosidade da solução de hibridação, facilitando o contato entre as moléculas.
SDS a 20%	20g de SDS em 100 mL água tratada com DEPC	Potente detergente utilizado para remover as ligações inespecíficas. Utilizar máscara durante a manipulação.

*A solução de hibridação é constituída pela solução de pré-hibridação acrescida da sonda desnaturada.

Quadro 6.8 – Preparo da solução de pré-hibridação.

Reagentes	Estoque	Volume final (10 mL)
Formamida a 50%	100%	5,0 mL
SSC concentrado 3×	20× concentrado	1,5 mL
Denhardt concentrado 10×	100× concentrado	2,0 mL
SDS a 2%	20%	1,0 mL
DNA de salmão 50 µg/mL	10 mg/mL	50,0µL
Água desionizada q.s.p.		450,0 µL

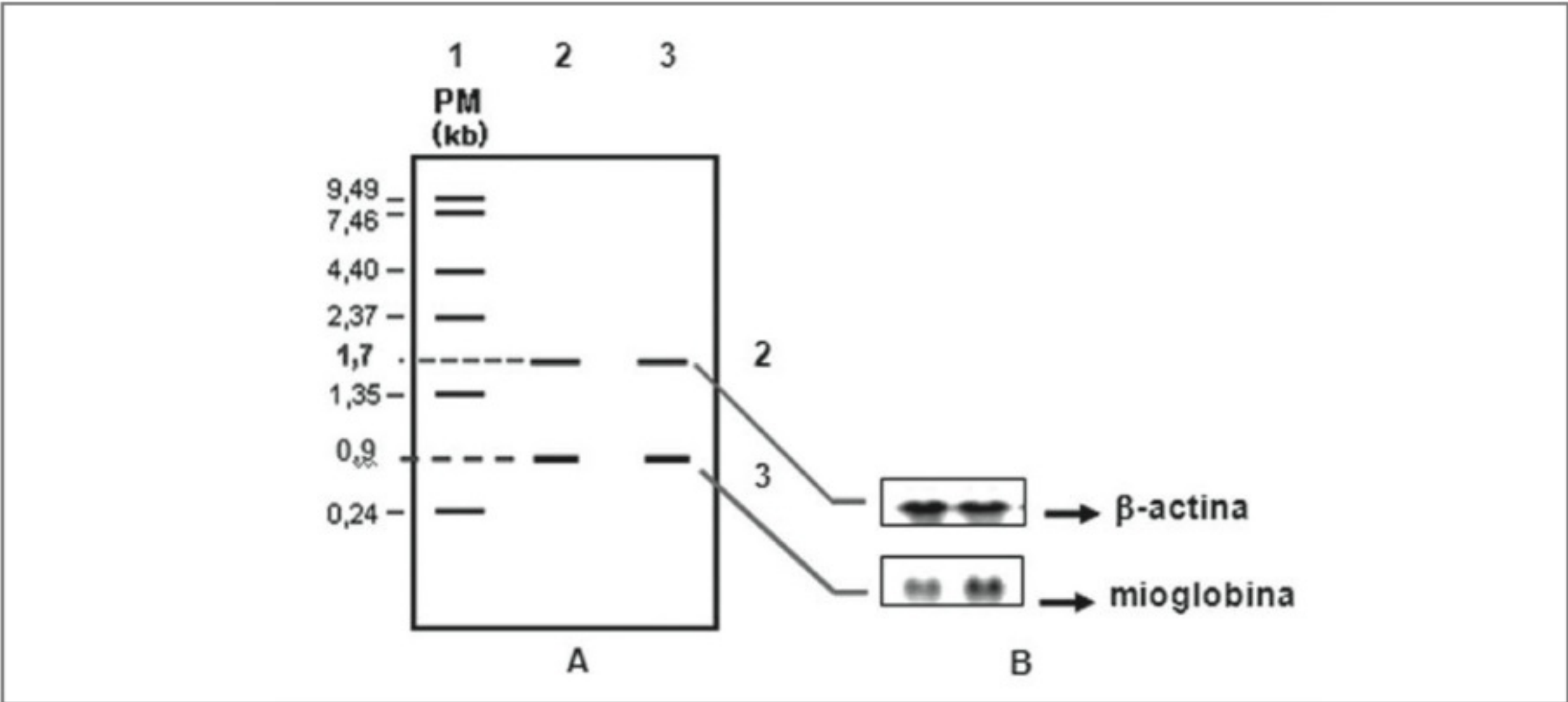


Figura 6.4 – Esquema da separação eletroforética do RNA total de músculo cardíaco de ratos e do sinal autorradiográfico dos genes β-actina e mioglobina, obtidos por meio da técnica de *Northern blotting*. (A) PM representa o marcador de peso molecular (RNA Ladder 0.24-9.5 kb – ; linhas 2 e 3 representam posição de migração do RNA mensageiro da β-actina e da mioglobina, respectivamente. (B) Sinal autorradiográfico do RNA mensageiro da β-actina e da mioglobina. (Cortesia da Dra Gisele Giannocco).

Referências

- Alwine, J.C.; Kemp, D.J.; Stark, G.R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74:5350-5354, 1977.
- Anderson, M.L.M.; Young, B.D. Quantitative filter hybridisation. In: Hames, B.D.; Higgins, S.J. eds. *Nucleic Acid Hybridisation a Practical Approach*. IRL Press, Cap. 4, 1985.
- Azevedo, M.de O. Centrifugação In: Azevedo, M. de O.; Felipe, M.S.S.; Brigido, M.de M.; Mranhão, A.Q; de Souza, M.T. eds. *Técnicas básicas em Biologia Molecular*. Editora UnB, Brasília, 2003, Cap.II.
- Blumberg, D. D. Creating a ribonuclease-free environment. *Meth. Enzymol.*, 152:20-24, 1987.
- Chabot, B. Synthesis and purification of RNA substrates. In: Higgins S.J, Hames, B.D. eds. *RNA Processing*, Vol.I, *A Practical Approach*,. Oxford (UK): Oxford Univ. Press, pp. 1-29, 1993.
- Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162:156-159, 1987.
- Chomczynski, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*, 15:532-537, 1993.
- Chomczynski, P.; Sacchi, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.*, 1:581-585, 2006.
- Church, G.M.; Gilbert, W. Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81(7):1991-1995, 1984.
- Dunbar, B.S. Protein Blotting. A practical Approach. JRL Press-Oxford. University-Press, 1994, p 242.
- Farrell, R.E. Jr. Resilient ribonucleases. In: *RNA Methodologies*. In: Farrell R.E. Jr. ed. Laboratory Guide for Isolation and Characterization. San Diego, CA: Academic Press, 1993, pp. 33-45.
- Farrell, R.E. Jr. RNA isolation strategies. In: Farrell R.E. Jr. ed. *RNA Methodologies*. In: Laboratory Guide for Isolation and Characterization, . San Diego, CA: Academic Press, 1993, pp. 46-91.
- Farrell, R.E. Jr. Electrophoresis of RNA. In: Farrell R.E. Jr. ed. *RNA Methodologies*. In: Laboratory Guide for Isolation and Characterization, . San Diego, CA: Academic Press, 1993, pp. 125-157.
- Farrell, R.E. Jr. The northern blot In: Farrell R.E. Jr. ed. *RNA methodologies*. In: Laboratory Guide for Isolation and Characterization. San Diego, CA: Academic Press, 1993, pp. 159-189.
- Farrell, R.E. Jr. Practical nucleic acid hybridization In: Farrell R.E. Jr. ed. *RNA methodologies*. In: Laboratory Guide for Isolation and Characterization. San Diego, CA: Academic Press, 1993, pp. 190-203.
- Gilman, M. Preparation and analysis of RNA. In: Ausubel F. M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. eds. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Wiley, Units 4.0.1-4.10.6, 1998.
- Kingston, R.E.; Chomczynski, P.; Sacchi, N. Guanidinium methods for total RNA preparation. In: Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G. eds. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Suppl 14, 1991, pp. 4.2.1-4.2.8.
- Krieg, P. *A Laboratory Guide to RNA. Isolation, analysis and synthesis*. Wiley-Liss, 1996. p. 405.
- Meltzer, J.C.; Sanders, V.; Grimm, P.C.; Chiasson, N.; Hoeltke, H.J.; Garrett, K.L.; Greemberg, A.H.; Nance, D.M. Nonradioactive northern blotting with biotinylated and digoxigenin-labeled RNA probes. *Electrophoresis*, 19(8-9): 1351-1355, 1998.
- Puissant, C.; Houdebine, L.M. An improvement of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *BioTechniques*, 8:148-149, 1990.
- Rapley, R. *The Nucleic Acid Protocols Handbook*. Ed. Humana Press, 2000, p 9-10.
- Saito, I.; Sugiyama, H.; Furukawa, N.; Matusiwa, I. Photochemical ring opening of thymidine in the presence of primary amines. *Tetrahedron lett.*, 22, 3265, 1981.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. Extraction, purification, and analysis of messenger RNA from eukaryotic cells. In: Nolan, C., ed. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2nd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, pp. 7.1-7.87.
- Sambrook, J.; Russell, D.W. Northern hybridization. In: *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 3rd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, pp. 7.42-7.85, .
- Schoenberg, D.R.; Cunningham, K.S. Characterization of mRNA endonucleases. *Methods*, 17(1):60-73, 1999.
- Trayhurn, P. Northern blotting. *Proc. Nutr. Soc.*, 55(1B):583-589, 1996.
- Williams, J.G.; Mason, P.J. Hybridisation in the analysis of RNA. In: Hames, B. D., Higgins, S. J. eds. *Nucleic Acid Hybridisation a Practical Approach*. IRL Press, Oxford, Cap. 6, 1985, pp. 139-160.
- Wilkinson, M. Purification of RNA. In: Brown T.A. ed. *Essential Molecular Biology, a Practical Approach*. Vol. I. Oxford: Oxford Univ Press, 1991, pp. 69-87.

7. Análise da Expressão Gênica por *Microarrays* de DNA

Patricia Severino
Eloiza Helena Tajara da Silva

Introdução

Na última década, com a sequência do genoma humano disponível, os cientistas depararam-se com a difícil tarefa de analisar a expressão gênica em níveis globais. Já em meados dos anos 1980, foram feitas as primeiras tentativas para atingir esse objetivo, precursoras dos atuais métodos de análise em larga escala. A abordagem, que é utilizada ainda hoje, resume-se na transferência de sequências de bibliotecas de DNA complementar (cDNA) para membranas de náilon, distribuídas em pontos de aproximadamente 300 microns e com densidade de cerca de 2.000 pontos por membrana. Tais *macroarrays* ou arranjos de cDNA são hibridados com cDNA gerado a partir de RNA total ou de mRNA purificado e marcado radiativamente (Fig. 7.1) e permitem comparar a intensidade da expressão de centenas de genes de forma simultânea. Quanto maior a expressão de um gene em determinada condição, maior será o número de moléculas de cDNA obtidas e, consequentemente, mais intenso o sinal resultante da hibridação.

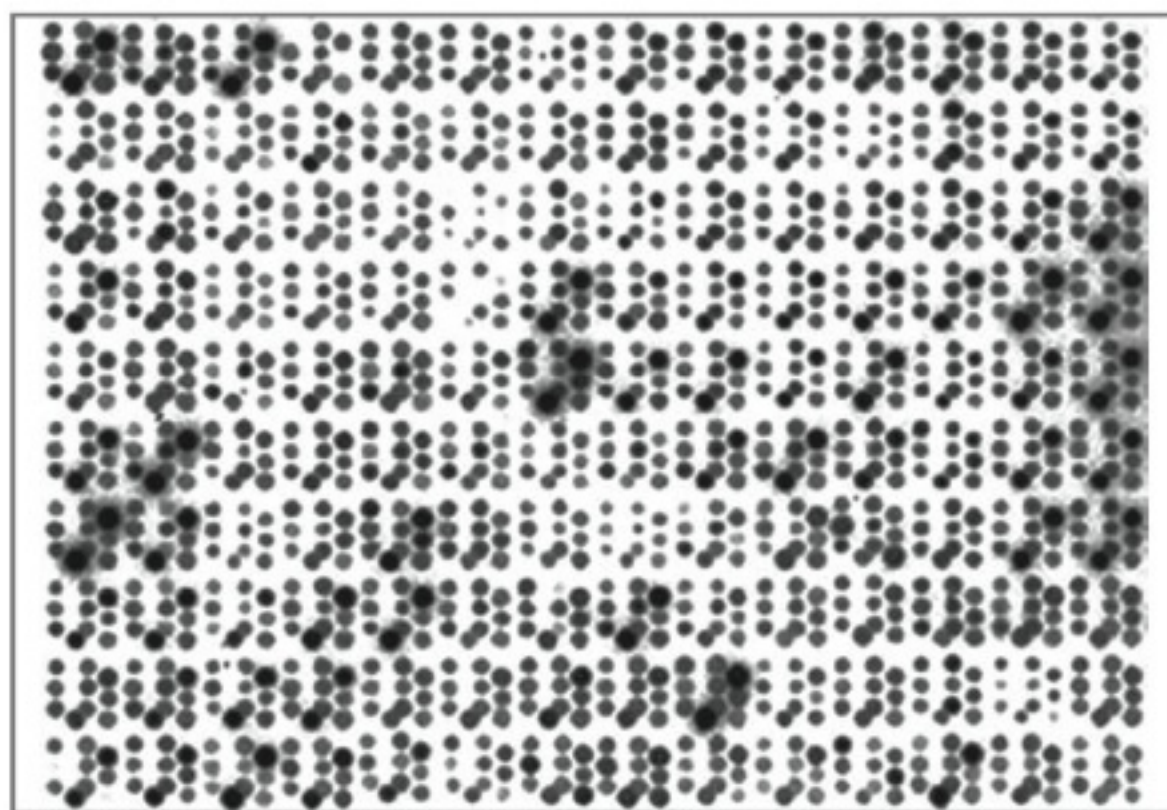


Figura 7.1 – Imagem de um *macroarray* hibridado com sondas marcadas com ^{33}P . Cada ponto representa um transcrito. Sinais mais fortes correspondem a uma concentração mais alta do transcrito na amostra de interesse.

Algumas limitações técnicas inerentes a esse tipo de experimento podem ser destacadas, como a porosidade da membrana e as dificuldades na sua manipulação e no manuseio do material radiativo. O desenvolvimento de arranjos em suportes sólidos (lâminas de vidro ou polímeros) permitiu que essas e outras dificuldades fossem superadas. Com esse novo tipo de arranjo, foi possível utilizar volume muito menor de material e, portanto, gerar pontos menores (com cerca de 150 microns) com maior densidade. Esta última característica foi especialmente favorecida pelo emprego de compostos fluorescentes para a detecção do sinal de hibridação, que oferecem muitas vantagens em relação ao material radiativo. Entre elas, estão sua sensibilidade, captura rápida do sinal, que é localizado e não disperso como no caso da radiatividade, a disponibilidade comercial de fluorocromos de diferentes cores, estabilidade dos reagentes e o fato de o processo de marcação ser direto (Waggoner, 2006).

Avanços em automação, robótica, fotolitografia e bioinformática também contribuíram para o rápido crescimento na utilização dos chamados *microarrays* de alta densidade, ou microarranjos de DNA, hoje uma técnica amplamente utilizada para a análise simultânea da expressão de milhares de genes.

Existem dois tipos básicos de *microarrays* utilizados para a análise da expressão gênica. O primeiro tipo compreende os *microarrays* confeccionados com fragmentos de DNA que, em relação a seu tamanho e sua natureza, podem ser de dupla fita, com cerca de 200 a 500 pares de bases e geralmente obtidos por PCR, ou oligonucleotídeos de fita única.

Os *microarrays* de cDNA são frequentemente construídos a partir de plasmídeos contendo insertos de cDNAs específicos amplificados por PCR. Alguns picolitros deste material são depositados sobre lâminas de

vidro por robôs, os chamados *spotters* capazes de depositar cerca de 100.000 pontos por lâmina. As principais vantagens desse tipo de *microarray* são sua flexibilidade, uma vez que o conteúdo da lâmina é determinado pelo pesquisador, e seu baixo custo, vantagens que o torna muito popular nos centros acadêmicos. Dentre as desvantagens está a quantidade variável de material que será depositada em cada ponto, dificilmente controlável devido ao tipo de tecnologia utilizado. Além disso, algumas reações de PCR (em geral, cerca de 10%) não são bem-sucedidas e, portanto, o ponto que deveria conter seu produto ficará vazio e não será identificado. Um outro problema é a falta de controle sobre a sequência dos produtos de PCR depositados, uma vez que são relativamente grandes, e questões sobre especificidade das hibridações são frequentemente levantadas. Para contornar tais problemas, esses *microarrays* são também confeccionados com oligonucleotídeos sintéticos (geralmente com 60-70 mer). Nesse caso, a concentração bem como a sequência dos fragmentos são rigorosamente controladas, vantagens importantes em relação aos *microarrays* de cDNA. Seu custo, entretanto, é mais elevado.

No segundo tipo de *microarray*, os fragmentos de DNA são sintetizados *in situ*. A primeira empresa a comercializar esse tipo de *microarray* foi a Affymetrix (Santa Clara, Califórnia, EUA. <http://www.affymetrix.com>). A tecnologia desse tipo de síntese combina a fotolitografia, originalmente utilizada na indústria de semicondutores, e a química combinatória (Fodor et al.,

1991). O processo fotolitográfico tem início com a cobertura do suporte com um composto químico fotossensível que impede a ligação direta entre o primeiro nucleotídeo da síntese e o suporte de vidro (Fig. 7.2). Máscaras litográficas são utilizadas para bloquear ou transmitir a luz em locais específicos da superfície, que é então recoberta com uma solução contendo os nucleotídeos adenina, citosina, guanina e timina. Em função da máscara, a ligação ocorre apenas nas regiões do suporte desprotegidas da ação da luz. Como o nucleotídeo ligado também possui um grupo protetor fotossensível, o processo se repete indefinidamente. Os alvos no *microarray* são construídos, portanto, pela repetição desse ciclo de exposição e ligação dos nucleotídeos em cada ponto do suporte até que atinjam seu comprimento final. Os alvos são desenhados por um *software* que identifica uma série de 11 sondas de 25 mer em cada transcrito a ser incluído no *microarray*. Cada uma delas é pareada com uma sonda *mismatch*, desenhada para conter uma mutação no seu centro que funcionará como controle da hibridação.

Uma outra empresa que comercializa *microarrays* sintetizados *in situ* é a Agilent (<http://www.agilent.com>). A tecnologia das impressoras do tipo *inkjet* é utilizada para o depósito de reagentes com alta precisão sobre lâminas de vidro de tamanho tradicional. Os oligonucleotídeos assim construídos possuem geralmente 60 mer e são únicos para cada transcrito-alvo, ao contrário da abordagem da Affymetrix. O que torna os *microarrays* de alta densidade produzidos tanto pela tecnologia de fotolitografia quanto por *inkjet* atrativos é a padronização dos processos de manufatura e hibridização da lâmina. Os resultados disso são dados com maior reprodutibilidade e com efeitos adversos facilmente controláveis por modelos e análises apropriados.

Os experimentos com *microarrays* produzem uma quantidade enorme de dados. Sua análise pode ser bastante complexa e requer *software* e bancos de dados especializados para armazenamento de informações. O tipo de análise depende da natureza dos experimentos realizados, podendo variar de testes estatísticos relativamente simples até programas sofisticados desenhados para resolver problemas específicos.

Os *microarrays* constituem uma plataforma de pesquisa relativamente nova, com aplicações diversificadas e ainda em desenvolvimento. Assim, apesar de abrangente, as metodologias e as aplicações apresentadas neste capítulo não são exaustivas, uma vez que seu objetivo central é fornecer um panorama global que possibilite a compreensão dessa tecnologia.

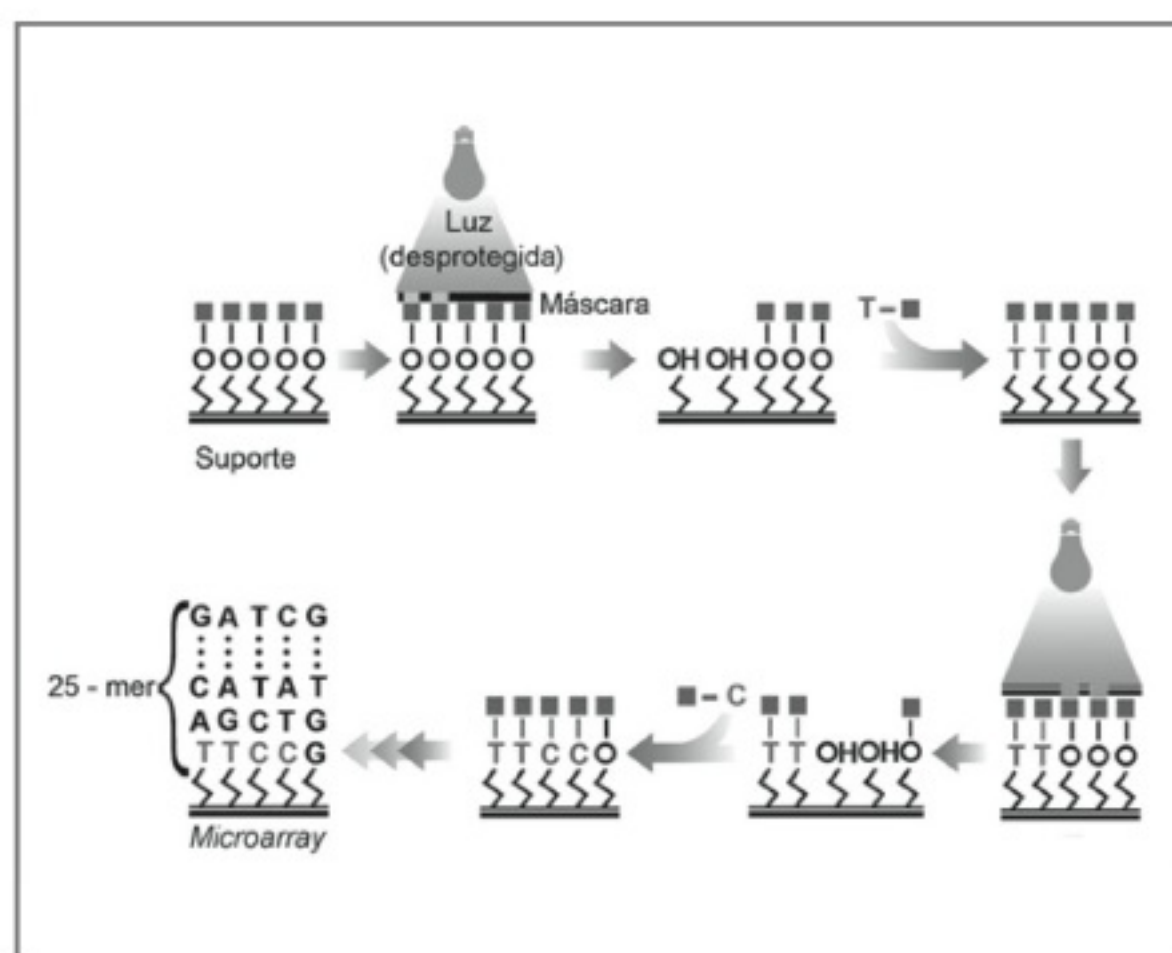


Figura 7.2 – A Affymetrix utiliza uma combinação única entre fotolitografia e química combinatória para a produção dos seus GeneChips®. (Fonte: adaptado de www.affymetrix.com.)

Metodologia

Desenho Experimental

Em linhas gerais, são duas as principais categorias de estudos em expressão gênica: as amostras podem ser utilizadas para fornecer informações sobre os genes, ou os genes podem fornecer informações sobre as amostras. A primeira situação representa uma abordagem integrada da biologia, na qual a regulação gênica pode ser estudada dentro de uma sofisticada rede de interações que determinam as respostas celulares observadas. Assim, a atividade de um gene deixa de ser estudada individualmente para ser analisada em um contexto celular. A segunda categoria é a que permite a classificação de doenças, seu diagnóstico e prognóstico, e possui aplicações diversas na indústria farmacêutica e na medicina, dentre as quais destacam-se a busca de novos alvos para drogas e a caracterização de respostas individuais a terapias.

A eficácia de um estudo utilizando *microarrays* depende de um desenho experimental adequado. O alto custo desse tipo de experimento é citado, muitas vezes, como a razão principal para desenhos experimentais que não correspondem ao ideal, especialmente em relação ao número de amostras. É importante ter em mente que o número de amostras, as chamadas réplicas técnicas ou biológicas, pode comprometer a interpretação dos resultados obtidos. Réplicas técnicas permitem a avaliação da variabilidade quanto à quantificação do material e à reprodutibilidade da plataforma; réplicas biológicas permitirão avaliar a variabilidade biológica entre os grupos. Diversos métodos estatísticos têm sido apresentados para calcular o número ideal de réplicas, um número que varia de acordo com o desenho experimental e com a variabilidade biológica das amostras (Pan, 2002; Pavlidis et al., 2003; Gadbury et al., 2004).

A variabilidade biológica das amostras pode ser caracterizada por diferenças genéticas, heterogeneidade celular no tecido e estágio da doença. Tal variabilidade é bastante alta na espécie humana porque os indivíduos são geneticamente heterogêneos, mas é bem pequena entre linhagens de camundongos isogênicos. Assim, um experimento envolvendo seres humanos requer um número de *microarrays* bem maior por grupo a ser comparado do que um experimento envolvendo camundongos isogênicos.

A heterogeneidade das amostras é uma variável muito importante no caso de tecidos sólidos ou biópsias de tumores, mas também em sangue periférico, cuja mistura de populações celulares também é complexa (Bakay et al., 2002). Alternativas experimentais que

podem diminuir este efeito incluem o isolamento de populações celulares puras por citometria de fluxo (FACS, do inglês *Fluorescence-Activated Cell Sorter*), isolamento de células por gradiente *ficoll-hypaque* associado a tecnologias que utilizam anticorpos dirigidos a alvos de interesse (como, por exemplo, RosetteSep da Stem Cell Technologies Seattle, WA, USA) e a microdissecação a laser (Emmert-Buck et al., 1996). A análise do perfil de expressão de populações celulares puras fornece informações mais facilmente interpretáveis, mas, por outro lado, perde dados sobre o microambiente.

Outras fontes de variabilidade nos padrões de expressão gênica associadas com o desenho experimental incluem o processo de remoção cirúrgica de amostras e seu processamento. Esses procedimentos variam bastante de um centro para outro e devem ser cuidadosamente planejados antes do início dos experimentos. Em particular, a situação de isquemia durante a remoção do tecido pode alterar a expressão gênica de forma significativa (Huang et al., 2001). Todas as amostras provenientes de cirurgias devem ser imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e, em seguida, estocadas a -80°C , ou temperaturas inferiores. Essa precaução é fundamental para manter a integridade dos transcritos, cujos níveis de degradação são significativos após 30 minutos à temperatura ambiente.

Obtenção de RNA

Apesar de existirem diferentes protocolos e tipos de *microarrays* disponíveis, a técnica tem sempre início com a extração de RNA de amostras biológicas em condições normais ou submetidas a intervenções. Métodos tradicionais para a extração de RNA total de células e tecidos incluem o reagente Trizol® (Invitrogen). O reagente é uma solução monofásica de fenol e isocianato de guanidina que mantém a integridade do RNA durante a homogeneização e a lise das amostras. Em linhas gerais, uma vez o material homogeneizado, a adição de clorofórmio seguida de centrifugação separa a solução em duas fases, uma aquosa e outra orgânica. O RNA é recuperado da fase aquosa após precipitação com álcool isopropílico e está, a princípio, livre de contaminação por DNA e proteínas. Trata-se de um método simples e relativamente rápido para a extração de RNA de boa qualidade. Ressalta-se a necessidade de trabalhar sempre sob condições de refrigeração, com material plástico livre de RNase e com luvas de látex para manipulação.

Muitos *kits* para extração de RNA também estão disponíveis comercialmente. Geralmente, os *kits* promovem a lise de células com uma solução que contém

grandes quantidades de íons caotrópicos. Esta solução é capaz de inativar as RNases, presentes em todo material biológico, e cria condições para a adsorção do RNA por uma matriz de sílica. O DNA também pode ficar retido nessa matriz e, por este motivo, alguns *kits* sugerem a aplicação direta de uma solução de DNase. Alguns passos de lavagem com tampões distintos removem sais, metabólitos e componentes celulares macromoleculares. Em uma etapa final, o RNA é eluído com água livre de RNase. Trata-se de uma alternativa prática, porém de alto custo, que fornece material de boa qualidade para experimentos com *microarrays*. É importante salientar que uma parte do RNA fica retida na matriz utilizada por esses *kits*, e essa retenção pode ser tamanho-específica, devendo, portanto, ser considerada no momento da escolha do *kit*.

A qualidade e a quantidade do RNA obtido são parâmetros essenciais para o sucesso e a reprodutibilidade do experimento. Ambas são geralmente avaliadas por métodos diferentes e complementares. Em espectrofotômetro, a densidade óptica da razão 260/280 deve ser superior a 1,8 (em geral entre 1,8 e 2,1) e as bandas correspondentes ao RNA ribossômico 18S e 28S devem ser claramente visualizadas em gel de agarose. Alternativamente, estas bandas podem ser avaliadas pelo equipamento Bioanalyser (Agilent). Esses critérios devem ser respeitados para que os resultados sejam confiáveis.

Marcação, Hibridização e Detecção do Sinal

Em protocolos tradicionais, o RNA da amostra a ser testada e o da amostra controle (entre 1 e 10 µg) são marcados com fluorocromos pela incorporação dos compostos Cy3 ou Cy5-dUTP durante a reação de transcrição reversa (Fig. 7.3). As amostras são, então, misturadas e hibridadas sob condições estridentes em um único *microarray*. A detecção da fluorescência é realizada por um microscópio confocal a laser. As imagens monocromáticas de cada *microarray* obtidas por este *scanner* são importadas por um *software*, quando recebem cores artificiais e são fusionadas. O *software* fornece informações específicas de cada *microarray*, incluindo a identificação de cada alvo e os valores de intensidade da fluorescência. As informações finais sobre cada *microarray* são dadas sob a forma de razões normalizadas (intensidades de Cy3/Cy5), nas quais desvios do valor 1 (nenhuma variação) indicam aumento (> 1) ou diminuição (< 1) dos níveis de expressão gênica em relação às amostras controle.

Em um protocolo também comum, o cRNA marcado é obtido por um processo de amplificação linear

e transcrição reversa *in vitro* a partir de uma quantidade inicial de material que pode se aproximar de 100 nm. A população de mRNA é submetida à transcrição reversa com a utilização de oligonucleotídeo de DNA que contém o promotor T7 da RNA polimerase e uma sequência d(T)_n. Depois da síntese da segunda fita de cDNA, o produto serve como base para a transcrição *in vitro*, que produzirá as sondas de cRNA marcado pela incorporação de nucleotídeos biotinilados ou com Cy3. A quantidade de cRNA biotinilado disponível para a hibridação varia entre 5 e 10 µg e deve ser aproximadamente 4 a 10 vezes a quantidade de material inicial e seu tamanho em gel de agarose deve estar entre 500 e 3.000 pb. Após a fragmentação sob alta temperatura e em solução apropriada, o cRNA deve possuir tamanhos entre 50 e 200 pb.

Após a hibridação, são realizadas etapas de lavagem para a remoção de sondas não hibridadas, e uma etapa de coloração com Cy5-estreptavidina, no caso da incorporação de nucleotídeos biotinilados, seguida de lavagens para a remoção do conjugado não ligado. A obtenção dos valores de intensidade de fluorescência é realizada de forma semelhante àquela descrita acima, com a diferença de que cada *microarray* contém informações sobre uma única amostra. Nesse caso, os valores relativos são obtidos pela comparação entre *microarrays* e não de uma mesma lâmina.

Para *macroarrays* construídos a partir de cDNA depositado sobre a membrana, a marcação da sonda pode ser realizada pela incorporação de ³³P durante a síntese do cDNA a partir de RNA extraído de amostras de interesse. Os *macroarrays* mais recentes também são confeccionados em membranas de náilon, porém utilizam oligonucleotídeos como alvos e a tecnologia para detecção do sinal de hibridação é a quimioluminescência (como exemplo, *arrays* da SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, MD, USA). Uma vez que a densidade desses *arrays* não é elevada, o foco de análise geralmente compreende processos específicos, tais como apoptose, ciclo celular e vias de transdução de sinal, ou a expressão de genes sabidamente associados com doenças como câncer, diabetes, cardiopatias e resposta imunológica.

Independentemente do tipo de *array* utilizado, o resultado final será sempre um número elevado de medidas de intensidade de fluorescência por amostra biológica. Uma vez que o experimento completo pode envolver desde alguns *microarrays* até centenas deles, a quantidade de informação gerada varia em função desses números.

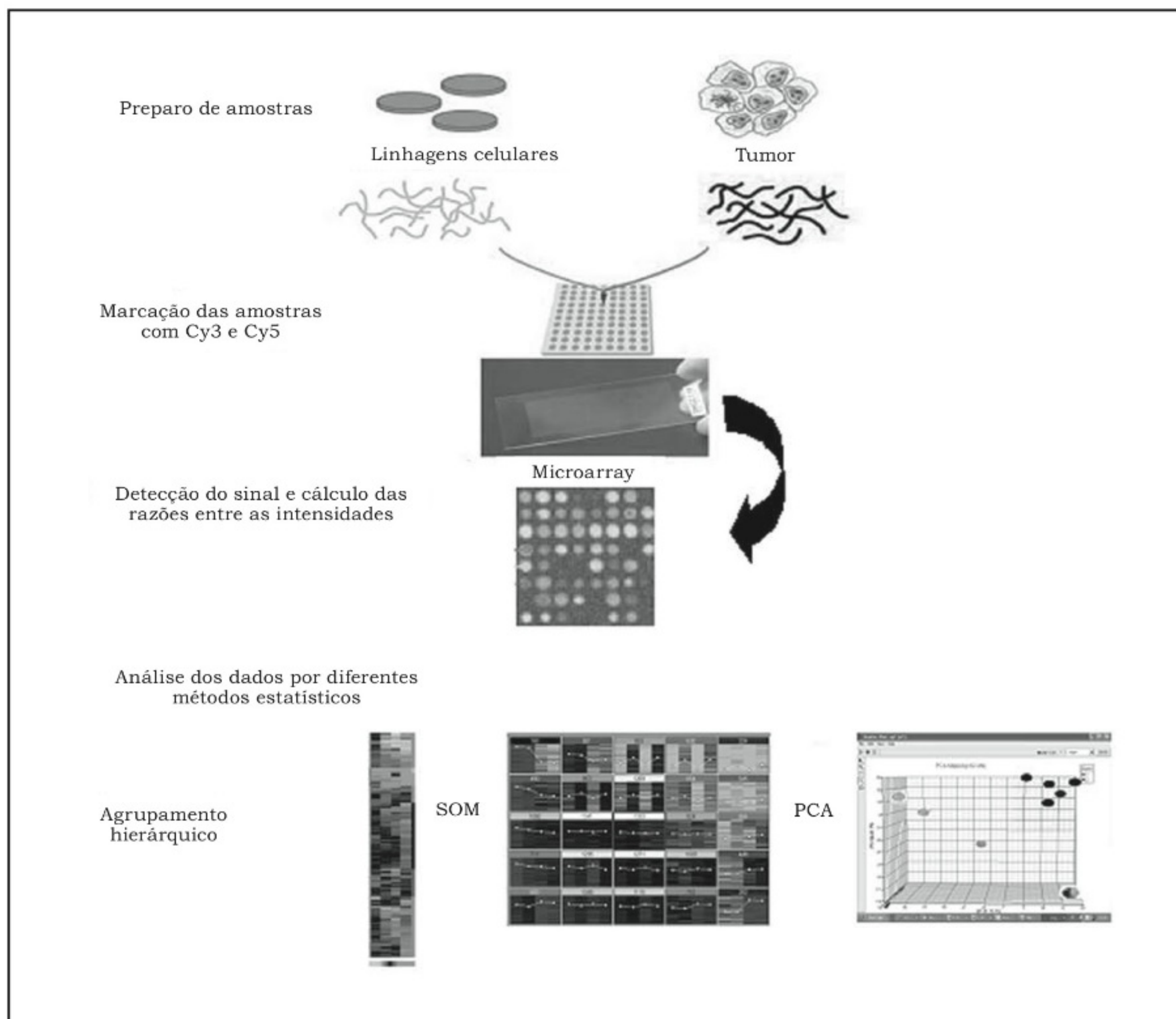


Figura 7.3 – Esquema representando experimentos com *microarrays* que utilizam Cy3/Cy5 para a marcação das sondas. O cDNA é marcado por meio da incorporação dos compostos Cy3 ou Cy5-dUTP durante a reação de transcrição reversa, as amostras são misturadas e hibridadas em um único *microarray*. As informações finais sobre cada *microarray* são intensidades representadas pelas cores cinza (aumento de expressão na amostra marcada com Cy3), preta (aumento de expressão na amostra marcada com Cy5) mista quando a expressão é equivalente. Após a coleta dos sinais, os valores normalizados são submetidos a análises por diferentes métodos estatísticos. SOM = Mapas auto-organizáveis; PCA = análise de componentes principais (adaptado com a permissão de Macmillan Publishers Ltd: Nature Clinical Practice Oncology Lønning et al., 2: 26-33, copyright 2005).

Análise de Resultados: Estatística e Bioinformática

Uma das grandes dificuldades do emprego de *microarrays* para estudos de expressão gênica é a manipulação de grandes quantidades de dados. A utilidade destes dados depende, em primeiro lugar, das informações disponíveis sobre cada uma das sequências associadas com cada ponto do *microarray*, ou seja, sobre os genes que elas representam. Também depende de um conhecimento profundo da biologia dos sistemas

estudados, caso contrário as informações obtidas não serão corretamente interpretadas. Pode-se dizer que a análise de dados procedentes de experimentos de *microarrays* possui um caráter exploratório e visa sugerir experimentos adicionais capazes de corroborar as observações coletadas. Diversos programas comerciais ou gratuitos estão disponíveis para a análise de dados de *microarrays*, mas nenhum deles, individualmente, é capaz de responder a todas as perguntas que podem ser propostas.

Normalização

O primeiro passo para a análise dos resultados de experimentos com *microarrays* consiste na normalização dos valores de intensidade entre os diferentes *arrays*, permitindo que estes valores sejam diretamente comparáveis entre si. Se um experimento utiliza diversos *microarrays*, é importante que as variações detectadas entre eles sejam de origem biológica; outros tipos de variação devem ser removidos para que as informações obtidas sejam fidedignas. Esse processo é chamado de normalização. Quando o desenho experimental utilizando uma mesma plataforma de *microarrays* compara dados coletados simultaneamente, com amostras representando populações celulares homogêneas e com uma mesma quantidade de RNA inicial, a normalização pode significar apenas um ajuste na intensidade total da luminosidade de cada *microarray*. Entretanto, e de forma geral, os estudos que utilizam esse tipo de tecnologia são bem mais complexos. Cuidados ressaltados no item “Desenho Experimental” favorecem resultados mais homogêneos, mas algumas correções são necessárias.

Correção do Ruído de Fundo (*Background*)

O primeiro ajuste a ser considerado avalia o *background* ou ruído do *microarray*. Esse efeito é geralmente causado por reflexos do laser sobre a superfície da lâmina, ou por sais ou outros resíduos remanescentes do processo de hibridação. A correção do *background* visa eliminar o efeito desse ruído. Diversos sistemas são utilizados com essa finalidade, variando de acordo com a plataforma e com o *software* escolhido. Um dos métodos básicos empregados para essa correção é a detecção do *background* local (*local neighborhood detection*), com a avaliação da área imediatamente ao redor do ponto, que define o ruído a ser subtraído do valor de intensidade do sinal. Trata-se de um tipo de correção robusta que leva em consideração pequenas variações presentes por todo o *microarray*. Entretanto, é preciso que os pontos estejam suficientemente espaçados para que a região tomada para cálculo do *background* não inclua a intensidade de um outro alvo.

Um outro tipo de correção do *background* utiliza controles negativos. Esses controles podem ser oligonucleotídeos aleatórios, genes bacterianos ou qualquer outra sequência que não hibridize com o genoma em análise. Trata-se de um sistema de correção global que não considera variações locais do *background*. Uma variação desse tipo de correção é a que utiliza sondas do tipo *mismatch*. Para cada alvo no *microarray*, existe um alvo com um ou dois nucleotídeos trocados que permi-

tem avaliar o fenômeno de hibridação cruzada de forma similar aos controles negativos. Essa abordagem permite uma análise da variação do *background* local, uma vez que os alvos com nucleotídeos trocados estão próximos ao alvo correto. Este tipo de análise é realizado pelo algoritmo MAS 5.0 para *microarrays* da Affymetrix.

Um último tipo de correção de *background* utiliza modelos estatísticos, que variam de acordo com o algoritmo escolhido. Dois algoritmos baseados em modelos e comumente empregados para a correção do *background* são o RMA (do inglês *Robust Multichip Average*, Bolstad et al., 2003, Irizarry et al., 2003) e o MBEI (do inglês *Model Based Expression Index*, Li e Wong, 2001).

Métodos de Normalização Estatística

Os estudos iniciais e principalmente aqueles com *macroarrays* e marcação radiativa utilizavam genes de expressão constitutiva, os chamados genes *housekeeping*, como controles para a normalização dos dados. A normalização com base na expressão de genes *housekeeping*, como o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) ou β -actina (ACTB), possui valor limitado, uma vez que a regulação destes genes pode variar, por exemplo, em tecidos tumorais e normais (Rubie et al., 2001; Khimani et al., 2005).

A forma de normalização mais simples consiste em colocar todos os *microarrays* de um experimento em uma mesma escala, de forma a igualar a média (ou valor total) da intensidade do sinal em todos eles. Esse procedimento parte do princípio de que a quantidade total de mRNA em cada amostra testada é a mesma, assume que a distribuição das intensidades é normal (Gauss) e simplesmente centraliza a distribuição ao redor de um valor determinado. O algoritmo MAS 5.0 da Affymetrix utiliza esta abordagem, porém com algumas modificações; ele elimina os valores numericamente muito distantes dos demais dados (1% dos valores mais elevados e 1% dos valores inferiores) e centraliza a média dos valores restantes.

Em experimentos que utilizam dois fluoróforos, a variação intensidade-dependente pode introduzir um viés nas informações coletadas. A normalização do tipo Lowess (ou Loess) fusiona os dados das duas cores e aplica um ajuste que remove tal variação. A curva Lowess gerada depois da normalização deve ser uma linha reta, indicando que a razão entre os valores obtidos com cada um dos dois fluoróforos não mais depende das intensidades. Esse tipo de normalização é eficaz quando a maioria dos genes não possui expressão diferencial entre as condições comparadas e quando os níveis de expressão dos genes muito e pouco expressos são simétri-

cos. Essas condições são encontradas em experimentos que estudam a expressão gênica global, no genoma, mas nem sempre são reais em *microarrays* personalizados que visam estudar regiões específicas de um genoma (Oshlack et al., 2007).

Um outro tipo de normalização é a por quantil (*quantile normalization*), no qual a distribuição das intensidades dos *microarrays* é modificada e transformada em uma distribuição comum entre eles (Bolstad et al., 2003). Apesar de ocorrer uma certa perda de informações, essa abordagem mantém as variações entre sinais, pois eles sofrerão menor influência de intensidades muito altas ou muito baixas. Os algoritmos RMA e MBEI utilizam esse tipo de normalização.

Identificação de Genes Diferencialmente Expressos

São inúmeras as abordagens para a análise de dados visando identificação de genes diferencialmente expressos. A aplicação de diferentes algoritmos matemáticos aos dados gerados pelos experimentos tem influência importante sobre as conclusões, isso porque o poder estatístico de identificação destes genes varia de acordo com os modelos escolhidos.

Os algoritmos estatísticos do tipo ANOVA (Análise de Variância, um teste estatístico que avalia diferenças entre as médias de dois ou mais grupos), testes t (testes que determinam se a diferença entre dois grupos é estatisticamente significativa por meio da comparação entre duas médias independentes) e testes não paramétricos como Mann-Whitney (Wilcoxon) são amplamente utilizados. Entretanto, as condições para a utilização desses testes são específicas e devem ser respeitadas para que os resultados sejam válidos.

A maioria dos experimentos com *microarrays* possui como característica a análise de uma grande quantidade de parâmetros de forma simultânea (os genes), e em um número limitado de amostras (os *microarrays*). Nesse tipo de situação, a análise de milhares de transcritos com a aplicação de valores α (probabilidade de obter um erro do tipo I) de forma semelhante ao que é realizado em outros tipos de análises estatísticas gera centenas de falso-positivos. A elevação no número de amostras pode aumentar o poder dos testes, mas é uma solução muitas vezes proibitiva devido ao custo desses experimentos. Para contornar esse problema, são utilizados tratamentos estatísticos específicos que minimizam o número de falso-positivos e falso-negativos, como o FDR (do inglês *False Discovery Rate*, Benjamini e Hochberg, 1995) e metodologias relacio-

nadas como MMMs (do inglês *Mixture Model Methods*, Alison et al., 2002).

Uma outra abordagem para a análise de conjuntos de resultados de expressão gênica consiste na sua classificação. Essa classificação pode ser realizada em função de categorias predeterminadas (abordagem supervisionada), ou sem o conhecimento prévio de categorias (abordagens não supervisionadas). Os algoritmos que realizam agrupamentos do tipo não supervisionado têm como objetivo a descoberta de classes ou grupos de genes coregulados. Cada um deles apresenta vantagens e desvantagens e devem ser avaliados dentro de contextos específicos antes da sua adoção para a interpretação de dados. Dentre eles, estão os mapas auto-organizáveis (SOM, do inglês *Self-Organizing Maps*) e a análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*), além do agrupamento hierárquico e do agrupamento por k -médias.

SOM é um tipo de análise matemática apropriada para o reconhecimento e a classificação de características em dados complexos e multidimensionais, como aqueles gerados em experimentos com *microarrays*. Essa abordagem foi utilizada, por exemplo, para a caracterização de grupos de hepatocarcinomas com diferentes graus de diferenciação (Iizuka et al., 2005). A análise de componentes principais é mais frequentemente utilizada para a visualização dos resultados e não como método analítico. Genes ou amostras são representados como pontos em um espaço multidimensional, de forma similar ao que ocorre nos SOMs. As componentes principais são representadas por vetores nesse espaço e capturam as variações presentes nesses pontos. A primeira componente captura uma parte maior da variação do que a segunda e assim sucessivamente (Raychaudhuri et al., 2000).

O agrupamento hierárquico gera agrupamentos de genes ou amostras que possuem padrões de expressão similares. É a técnica mais frequentemente utilizada para a análise de dados de *microarrays*. Os resultados são apresentados sob a forma de dendogramas, árvores completas onde as folhas representam padrões individuais (genes ou experimentos), e a raiz, o ponto de convergência de todos os galhos. Entretanto, dado o número elevado de genes, sempre serão observados agrupamentos e esses nem sempre terão valor biológico significativo. A interpretação dos resultados, portanto, deve ser realizada com cautela e considerar o conhecimento sobre a biologia do sistema.

Métodos supervisionados têm como objetivo encontrar genes diferencialmente expressos entre grupos de amostras ou classificar determinada amostra, ou genes,

dentro de categorias conhecidas. Entre algoritmos de classificação supervisionada está o SVM (do inglês *Support Vector Machine*) (Brown et al., 2000). SVMs visam encontrar as combinações de genes que melhor separam amostras biológicas. Um exemplo de aplicação é a classificação de neoplasias. A seleção de genes capazes de prever a qual classe de tumor determinada amostra pertence é feita a partir de um número bastante elevado de genes expressos em um número relativamente pequeno de amostras. A seleção deve considerar, ainda, quais são os genes que melhor contribuem para a classificação das amostras.

Apresentação e Validação dos Resultados

Uma preocupação crescente dentro da comunidade científica é o desenvolvimento de métodos que possibilitem o compartilhamento de informações entre plataformas experimentais e grupos de pesquisa independentes visando um melhor aproveitamento dos resultados de *microarrays*. Esse é o objetivo principal do grupo de discussão denominado Microarray Gene Expression Data Society (MGED), constituído por biólogos e cientistas computacionais especialistas em *microarrays*. Em 2001, esse grupo formulou um guia para anotação de plataformas de *microarrays* e apresentação de resultados (MIAME, do inglês Minimum Information About A Microarray Experiment) que inclui informações sobre o desenho experimental (número e característica de amostras), preparação e marcação das amostras, parâmetros de hibridação e coleta de dados (Brazma et al., 2001). Esse guia não tem como objetivo definir como os experimentos devem ser realizados, e sim fornecer uma quantidade de informações adequadas associadas com cada experimento publicado ou disponível ao público de maneira que os experimentos possam ser reproduzidos ou aproveitados pela comunidade acadêmica. Grande parte dos periódicos conceituados exige que a apresentação dos resultados esteja de acordo com essas regras antes de permitir sua publicação.

As informações geradas por experimentos com *microarrays* são complexas, o que permite reanálises por grupos independentes com interesses diferentes ou mesmo semelhantes sobre determinado tema. A busca por informações complementares dentro de um conjunto de dados abre possibilidades para novas descobertas ou para a corroboração de resultados obtidos independentemente. Essas estratégias favorecem o desenvolvimento da tecnologia e colaboram para acelerar o processo que visa à aplicação dos resultados, principalmente em biomedicina.

Ao lado disso, a necessidade de validar questões operacionais de experimentos com *microarrays* é um consenso em pesquisa. A variação de expressão entre duas amostras pode ser um fato que ocorre ao acaso, principalmente quando um número elevado de transcritos é testado. Esse tipo de evento é chamado de erro do tipo I (ou falso-positivo) e deve-se à variabilidade aleatória durante a amostragem. Para a constatação de que os resultados obtidos em um estudo não sejam falso-positivos, recomenda-se a avaliação da expressão de transcritos selecionados em novas amostras biológicas, mas mantendo o desenho experimental inicial. Essa avaliação pode ser realizada, por exemplo, por procedimentos que analisam a abundância de mRNA de formas outras que o *microarray*, como por PCR em tempo real por exemplo. A utilização desse tipo de análise em uma nova amostragem do mesmo material biológico já utilizado para o experimento com *microarray* possui pouca contribuição para a validação dos resultados, uma vez que não fornece informações adicionais, além de um controle da qualidade técnica da plataforma de *microarray* escolhida. Técnicas como a imunistoquímica e abordagens de proteômica fornecem informações complementares aos experimentos com *microarrays* e são desejáveis no momento da validação dos resultados.

Aplicações e Considerações Finais

A tecnologia de *microarrays*, além de seu uso em pesquisa básica na área de genômica funcional, auxiliando na identificação de funções de genes novos ou ainda não bem caracterizados, possui uma infinidade de usos específicos e de aplicações com grande potencial em Biomedicina.

Dentre essas aplicações está a identificação de padrões metabólicos ou genes correlacionados com diagnóstico e prognóstico em doenças humanas; o objetivo neste caso é selecionar biomarcadores com características facilmente mensuráveis durante a pesquisa clínica, por exemplo. Em Infectologia e Microbiologia, padrões de expressão gênica têm sido avaliados tanto para o diagnóstico de infecções quanto para a caracterização da resposta do hospedeiro a diferentes patógenos e drogas utilizadas para seu controle (Jenner e Young, 2005). Em Farmacologia, os *microarrays* permitem determinar padrões diferentes de expressão gênica em tecidos submetidos a várias drogas ou doses de determinado medicamento. A especificidade de alvos pode ser avaliada comparando-se o efeito de um composto de ação conhecida com novos compostos, cuja atividade se pretende testar (Ross et al., 2000; Scherf et al., 2000). Em

Toxicologia, padrões de expressão gênica em organismos-modelo ou em tecidos podem sugerir efeitos adversos para o homem. Farmacogenômica e toxicogenômica são dois termos atuais que representam uma fusão entre a genômica funcional e a farmacologia molecular. Essas áreas visam encontrar correlações entre a resposta a drogas e toxicidade e o perfil genético dos pacientes, respectivamente.

No caso de doenças complexas e multigênicas, o grande desafio é a identificação de genes associados com o risco aumentado para o desenvolvimento da doença. O primeiro passo para a identificação desses genes compreende análises de ligação (*linkage*), uma técnica capaz de revelar as regiões cromossômicas envolvidas. Entretanto, essas regiões são geralmente grandes demais para permitir o rastreamento rápido de genes com um papel importante na etiopatogenia. A análise da expressão gênica por *microarrays* pode ajudar nessa busca, uma vez que fornece indícios do envolvimento de genes específicos em processos celulares associados com a doença. A síntese da informação fornecida por duas linhas independentes de busca de evidências, o estudo de *linkage* e o *microarray*, é o que torna a abordagem mais consistente (Li et al., 2001).

Em relação ao câncer, sua aplicação atinge diferentes níveis. Na maioria das vezes, o diagnóstico convencional dos múltiplos tipos dessa doença é baseado na aparência de tecidos corados e analisados por patologistas treinados. A utilização de *microarrays* oferece uma alternativa para sua classificação e avaliação de prognóstico com base no perfil de expressão gênica. Os resultados podem revelar comportamentos biológicos e respostas a tratamento que diferem de acordo com subtipos definidos pelo perfil de expressão, também chamado de assinatura molecular do tumor. Dentre os primeiros trabalhos que apresentaram resultados utilizando esse tipo de abordagem, está o de Golub et al. (1999). Esses autores utilizaram um sistema de classificação baseado no monitoramento da expressão gênica global em leucemias agudas e foram capazes de distinguir entre leucemia mieloide aguda e leucemia linfoblástica aguda. Em câncer de mama, van de Vijver et al. (2002) associaram o perfil de expressão de 70 genes previamente selecionados ao prognóstico de pacientes com carcinoma primário de mama. Seus resultados levaram ao desenvolvimento de um exame, o *MamaPrint*, já aprovado pelo FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) e comercializado para acompanhamento de pacientes específicos.

Apesar de grandes avanços, a utilização de *microarrays* na rotina clínica ainda não é uma realidade e compreende um grande desafio que envolve principalmente a redução de seus custos e a automatização na preparação de amostras e na análise de resultados. Os dados disponíveis na literatura, entretanto, não deixam dúvidas sobre sua importância na geração de biomarcadores potenciais e de informações sobre os mecanismos de desenvolvimento e progressão de doenças.

Referências

- Alison, D.B.; Gadbury, G.L.; Heo, M.; Fernández, J.R.; Lee, C.K.; Prolla, T.A.; Weindruch, R. A mixture model approach for the analysis of microarray gene expression data. *Comput. Stat. Data Analysis* 39:1-20, 2002.
- Bakay, M.; Chen, Y.W.; Borup, R.; Zhao, P.; Nagaraju, K.; Hoffman, E.P. Sources of variability and effect of experimental approach on expression profiling data interpretation. *BMC Bioinformatics*, 3:4-15, 2002.
- Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate – a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B.*, 57:289-300, 1995.
- Bolstad, B.M.; Irizarry, R.A.; Astrand, M.; Speed, T.P. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, 19:185-193, 2003.
- Brazma, A.; Hingamp, P.; Quackenbush, J.; Sherlock, G.; Spellman, P.; Stoeckert, C.; Aach, J.; Ansorge, W.; Ball, C.A.; Causton, H.C.; Gaasterland, T.; Glenisson, P.; Hols-tege, F.C.; Kim, I.F.; Markwitz, V.; Matese, J.C.; Parkinson, H.; Robinson, A.; Sarkans, U.; Schulze-Kremer, S.; Stewart, J.; Taylor, R.; Vilo, J.; Vingron, M. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat. Genet.*, 29(4): 365-371, 2001.
- Brown, M.P.; Grundy, W.N.; Lin, D.; Cristianini, N.; Sugnet, C.W.; Furey, T.S.; Ares, M.Jr.; Haussler, D. Knowledge-based analysis of microarray gene expression data by using support vector machines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:262-267, 2000.
- Emmert-Buck, M.R.; Bonner, R.F.; Smith, P.D.; Chuaqui, R.F.; Zhuang, Z.; Goldstein, S.R.; Weiss, R.A.; Liotta, L.A. Laser capture microdissection. *Science*, 274:998-1001, 1996.
- Fodor, S.P.A.; Read, J.L.; Pirrung, M.C.; Stryer, L.; Lu, A.T.; Solas, D. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, 251:767-773, 1991.
- Gadbury, G.L.; Grier, P.P.; Edwards, J.; Tsuyoshi, K.; Prolla, T.A.; Weindruch, R.; Permana, P.A.; Dmoutz, J.; Allison, D.B. Power analysis and sample size estimation in the age of high dimensional biology: a parametric boot-

- strap approach and examples from microarray research. *Stat. Methods Med. Res.*, 13:325-338, 2004.
- Golub, T.R.; Slonim, D.K.; Tamayo, P.; Huard, C.; Gaasenbeek, M.; Mesirov, J.; Coller, H.; Loh, M.L.; Downing, J.R.; Caligiuri, M.A.; Bloomfield, C.D.; Lander, E.S. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 286: 531-537, 1999.
- Huang, J.; Qi, R.; Quackenbush, J.; Dauway, E.; Lazaridis, E.; Yatman, T. Effects of ischemia on gene expression. *J. Surg. Res.*, 99:222-227, 2001.
- Irizarry, R.A.; Hobbs, B.; Collin, F.; Beazer-Barclay, Y.D.; Antonellis, K.J.; Scherf, U.; Speed, T.P. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, 4:249-264, 2003.
- Iizuka, N.; Oka, M.; Yamada-Okabe, H.; Mori, N.; Tamesa, T.; Okada, T.; Takemoto, N.; Sakamoto, K.; Hamada, K.; Ishitsuka, H.; Miyamoto, T.; Uchimura, S.; Hamamoto, Y. Self-organizing-map-based molecular signature representing the development of hepatocellular carcinoma. *FEBS Lett*, 579:1089-1100, 2005.
- Jenner, R.G.; Young, R.A. Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nature Rev. Microbiol.*, 3:281-294, 2005.
- Khimani, A.H.; Mhashilkar, A.M.; Mikulskis, A.; O'Malley, M.; Liao, J.; Golenko, E.E.; Mayer, P.; Chada, S.; Killian, J.B.; Lott, S.T. Housekeeping genes in cancer: normalization of array data. *Biotechniques*, 38:739-745, 2005.
- Li, Y.J.; Oliveira, S.A.; Xu, P.; Martin, E.R.; Stenger, J.E.; Scherzer, C.R.; Hauser, M.A.; Scott, W.K.; Small, G.W.; Nance, M.A.; Watts, R.L.; Hubbel, J.P.; Koller, W.C.; Pahwa, R.; Stern, M.B.; Hiner, B.C.; Jankovic, J.; Goetz, C.G.; Matastaglia, F.; Middleton, L.T.; Roses, A.D.; Saunders, A.; Schmechel, D.E.; Gullans, S.R.; Haines, J.L.; Gilbert, J.R.; Vance, J.M.; Pericak-Vance, M.A.; Hulette, C.; Welsh-Bohmer, K.A. Glutathione S-transferase omega-1 modifies age-at-onset of Alzheimer disease and Parkinson disease. *Hum. Mol. Genet.*, 12: 3259-3267, 2003.
- Li, C.; Wong, W.H. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:31-36, 2001.
- Linning, P.E.; Sorlie, T.; Borresen-Dale, A.L. Genomics in breast cancer-therapeutic implications. *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, 2(1):26-33, 2005.
- Oshlack, A.; Emslie, D.; Corcoran, L.M.; Smyth, G.K. Normalization of boutique two-color microarrays with a high proportion of differentially expressed probes. *Genome Biol.*, 8(1):R2, 2007.
- Pan, W.; Lin, J.; Le, C.T. How many replicates are required to detect gene expression changes in microarray experiments? A mixture model approach. *Genome Biol.*, 3(5):22, 2002.
- Pavlidis, P.; Li, Q.; Noble, W. The effect of replication on gene expression microarray experiments. *Bioinformatics*, 19:1620-1627, 2003.
- Raychaudhuri, S.; Stuart, J.M.; Altman, R.B. Principal components analysis to summarize microarray experiments: application to sporulation time series. *Pac. Symp. Biocomp.*, 5:452-463, 2000.
- Ross, D.T.; Scherf, U.; Eisen, M.B.; Perou, C.M.; Rees, C.; Spellman, P.; Iyer, V.; Jeffrey, S.S.; Van de Rijn, M.; Waltham, M.; Pergamenschikoy, A.; Lee, J.C.; Lashkari, D.; Shalon, D.; Myers, T.G.; Weinstein, J.N.; Botstein, D.; Brown, P.O. Systemic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat. Genet.*, 24:227-235, 2000.
- Rubie, C.; Kempf, K.; Hans, J.; Su, T.; Tilton, B.; Georg, T.; Brittner, B.; Ludwig, B.; Schilling, M. Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. *Mol. Cell. Probes*, 19:101-109, 2001.
- Scherf, U.; Ross, D.T.; Waltham, M.; Smith, L.H.; Lee, J.K.; Tanabe, L.; Kohn, K.W.; Reinhold, W.C.; Myers, T.G.; Andrews, D.T.; Scudiero, D.A.; Eisen, M.B.; Sausville, E.A.; Pommier, Y.; Boltstein, D.; Brown, P.O.; Weinstein, J.N. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat. Genet.*, 24:236-244, 2000.
- van de Vijver, M.J.; He, Y.D.; van't Veer, L.J.; Dai, H.; Hart, A.A.; Voskuil, D. W.; Schreiber, G.J.; Peterse, J.L.; Roberts, C.; Marton, M.J.; Parrish, M.; Atsma, D.; Witteveen, A.; Glas, A.; Delahaye, L.; van der Velde, T.; Bartelink, H.; Rodenhuis, S.; Rutgers, E.T.; Friend, S.H.; Bernards, R. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med.*, 347(25):1999-2009, 2002.
- Waggoner, A. Fluorescent labels for proteomics and genomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 10:62-66, 2006.

8. Análise da Expressão Gênica por Ensaio de Proteção a Ribonuclease

Daniel Giannella Neto
Maria Lúcia Cardilho Corrêa Giannella

Introdução

O ensaio de proteção à ribonuclease (RPA: *ribonuclease protection assay*) é um método sensível e específico para a detecção e quantificação de espécies de RNA mensageiro (mRNA) em amostras de RNA total. Diferentemente do *Northern blotting*, no qual a hibridação é realizada com o RNA adsorvido a uma membrana, no RPA a hibridação é feita em solução, utilizando-se uma sonda de RNA complementar à sequência do mRNA que se quer estudar (mRNA-alvo). O produto da hibridação é submetido a um tratamento com RNases, enzimas capazes de digerir apenas fitas simples de RNA.

Assim, os transcritos de mRNA-alvo que se hibridaram à sonda e formaram RNA dupla-fita são protegidos da digestão, enquanto todos os mRNAs que não se ligaram à sonda e o excesso de sonda (fitas simples) são destruídos pelas RNases. Os fragmentos dupla-fita (fragmentos “protegidos”) são, então, separados eletroforicamente em gel de poliacrilamida, o qual, desidratado ou não, é exposto a um filme radiográfico para que o sinal da sonda marcada possa ser mensurado. A intensidade do sinal gerado é diretamente proporcional à quantidade de mRNA-alvo na amostra de RNA total (Fig. 8.1). Caso uma sonda para um controle interno (*gene housekeeping*) ou a fita idêntica à sequência do mRNA-alvo (fita *sense*)

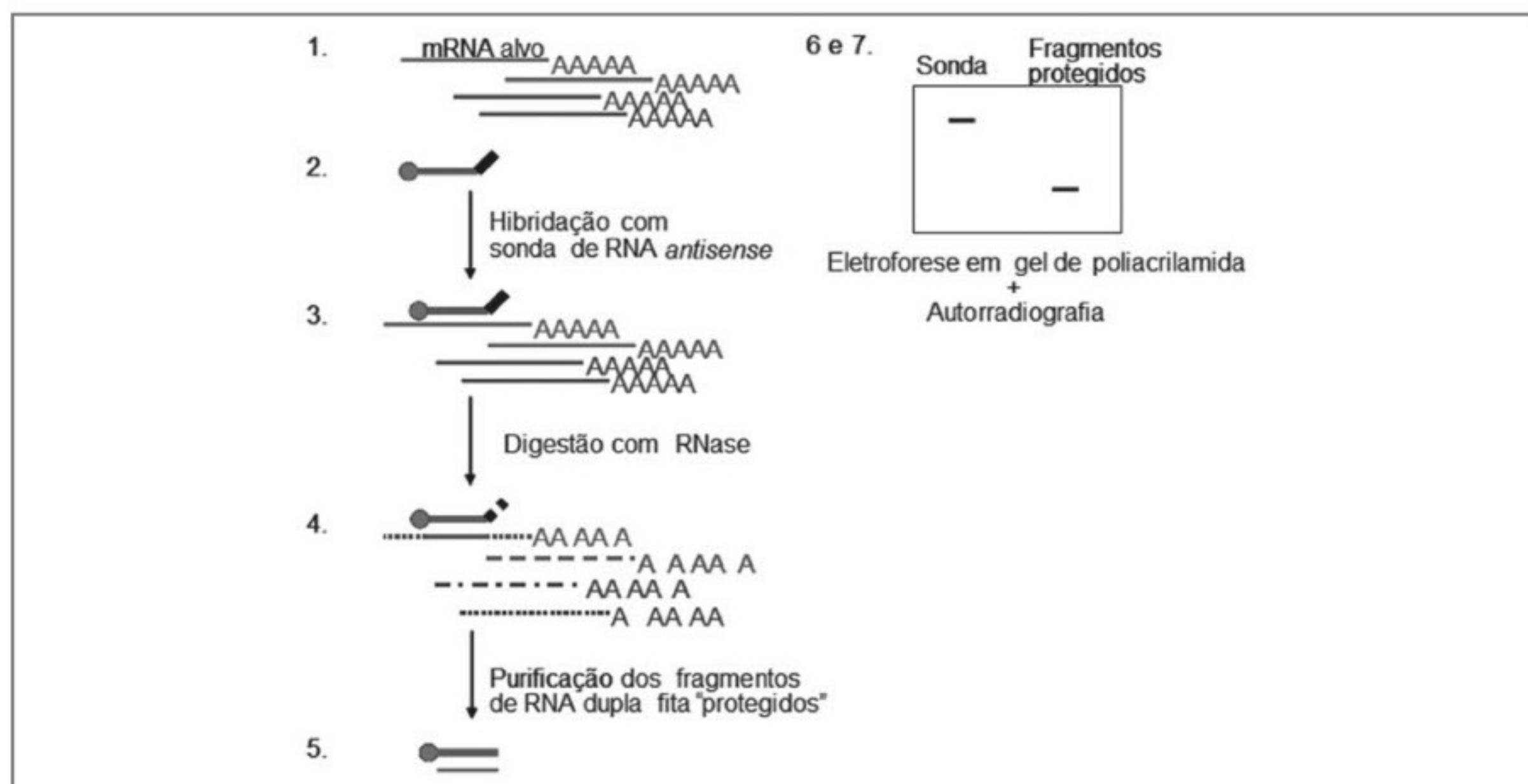


Figura 8.1 – Representação esquemática das etapas do ensaio de proteção a ribonuclease 1. Isolamento do RNA total da amostra de célula ou tecido. 2. Síntese da sonda radiativa. 3. Hibridação da sonda marcada com o RNA total para a formação de RNA dupla-fita (mRNA-alvo – sonda). 4. Tratamento do produto da hibridação com RNases específicas para RNAs de fita simples que degradam o excesso de sonda que não se hibridou e os mRNA não alvo. 5. Purificação dos RNA dupla-fita (fragmentos protegidos). 6 e 7. Separação dos fragmentos protegidos resistentes às RNases em um gel desnaturante de poliacrilamida e posterior secagem do gel e exposição a um filme radiográfico.

sintetizada *in vitro* seja incluída no procedimento, o ensaio pode ser usado, respectivamente, para a quantificação relativa ou absoluta dos transcritos de mRNA-alvo.

A realização deste ensaio foi possibilitada pela identificação e caracterização das RNA polimerases dependentes de DNA dos bacteriófagos SP6, T7 e T3 e pela elucidação de suas sequências promotoras. Essas polimerases são ideais para a síntese de sondas de RNA com alta atividade específica a partir de sequências de DNA “molde”, pois apresentam alto grau de fidelidade a seus promotores, são capazes de permitir altas taxas de polimerização, transcrevem segmentos longos de modo eficiente e não necessitam de altas concentrações de ribonucleotídeos (rNTPs). Dessa forma, uma sequência de DNA complementar (cDNA) que codifica um fragmento do mRNA-alvo pode ser subclonada em um plasmídeo que contém promotores de bacteriófagos, e essa construção pode ser usada como molde para a síntese de sondas de RNA marcadas (radiativamente ou não) complementares à sequência do mRNA-alvo (sondas *antisense*).

A técnica de RPA envolve as etapas descritas abaixo. Em todas elas, devem ser tomadas precauções para evitar a contaminação com RNases:

1. Extração do RNA total dos tecidos / células nas condições experimentais que se quer investigar. Recomenda-se a utilização de protocolos de extração que resultem em RNA total de alta qualidade.
2. Síntese de uma sonda de RNA marcada complementar à sequência de mRNA-alvo (sonda *antisense*) – tarde do 1º dia.
3. Hibridação da sonda marcada com o RNA total – noite do 1º dia.
4. Tratamento do produto da hibridação com RNases específicas para RNAs de fita simples, que degradam o excesso de sonda que não se hibridou e os mRNA não alvo – 2º dia.
5. Purificação dos fragmentos protegidos – 2º dia.
6. Separação dos fragmentos protegidos resistentes às RNases (híbridos mRNA-alvo – sonda *antisense*) em um gel denaturante de poliacrilamida – 2º dia.
7. Secagem do gel e exposição a um filme radiográfico para a quantificação da sonda “protegida” pelo mRNA-alvo – 2º dia.

Recomendações Gerais

Os cuidados que devem ser tomados em relação à contaminação com RNases variam nos diferentes labo-

ratórios. Recomenda-se o uso sistemático de luvas no manuseio dos reagentes e em todas as etapas do RPA, e de água ultrapura livre de RNase. tubos e ponteiros autoclavados. Caso exista a suspeita de que esteja ocorrendo contaminação de reagentes com RNases, recomenda-se fazer alíquotas de todos os reagentes em pequenos volumes e a utilização de ponteiros com barreira. Alguns laboratórios tratam a água ultrapura, os tubos e as ponteiros com DEPC (dietilpirocarbonato), substância capaz de inativar nucleases, inclusive RNases. A forma mais segura de se fazer soluções livres de RNases é a utilização de reagentes *molecular biology grade* (grau de biologia molecular) em água ultrapura tratada com DEPC (água ultrapura tratada com DEPC a 0,1% por aproximadamente 12 h e posteriormente autoclavada durante 20 min).

Síntese de RNA *In Vitro* – Sonda *Antisense* Radiativa

Para a síntese *in vitro* de moléculas de RNA de fita simples, utilizam-se vetores contendo múltiplos sítios de clonagem (*multiple cloning site* – MCS) flanqueados de cada um dos lados por sequências promotoras para as polimerases dos bacteriófagos SP6, T7 ou T3 (Fig. 8.2). Estas construções permitem tanto a síntese de moléculas de RNA *sense* como de RNA *antisense* a partir das sequências clonadas no MCS. Os plasmídeos são, geralmente, linearizados com uma enzima de restrição para que os transcritos de RNA sintetizados tenham um tamanho definido. Além de plasmídeos, produtos de PCR e oligonucleotídeos sintéticos podem ser usados em reações de transcrição, desde que contenham a sequência promotora para as polimerases dos bacteriófagos.

A sensibilidade do RPA depende da atividade específica da sonda, definida como o nível de radiatividade (medida em contagens por minuto ou “cpm”) presente no produto da reação de transcrição *in vitro* em relação à massa total desse produto. Um dos quatro nucleotídeos acrescentado à reação, por exemplo, uridina trifosfato (UTP), é marcado com [³²P] e a radiatividade é determinada pela quantidade de UTP radiativo incorporada ao transcrito durante a reação de transcrição. A atividade específica dependerá somente da relação [³²P]-UTP:UTP não marcado adicionado à reação. A concentração do nucleotídeo marcado é geralmente o fator limitante da reação, de forma que, se a concentração do “nucleotídeo limitante” é muito baixa, a RNA polimerase não propicia a síntese de transcritos completos (transcritos *full-length*). Assim, quando somente se acrescenta UTP marcado à reação, obtém-se uma sonda

de alta atividade específica, no entanto, os transcritos de RNA podem ficar incompletos, pois a baixa concentração de UTP, que foi fornecido apenas pela solução de [^{32}P]-UTP, limita a transcrição. Ao se acrescentar UTP não marcado à reação, obtêm-se sondas transcritas completas, no entanto, perde-se na atividade específica da sonda. Quanto maior a concentração de nucleotídeo limitante não marcado adicionado à reação, menor a atividade específica da sonda. A concentração do nucleotídeo limitante deve ser maior que 3 μM para a maioria dos transcritos menores que 400 nucleotídeos (concentrações maiores podem ser necessárias para a síntese de transcritos maiores). Quando se quer sondas com atividade específica muito alta, deve-se omitir o nucleotídeo limitante não marcado.

O volume da reação deve ser pequeno para que a concentração do nucleotídeo marcado seja otimizada sem que se aumente muito o custo deste ensaio. Geralmente se utiliza o [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$] CTP ou UTP nas concentrações de 800 Ci/mmol e 10 mCi/mL. O uso de 50 μCi de [^{32}P]NTP nestas concentrações em um volume de reação de 20 μL resulta em uma concentração de 3,125 μM do [^{32}P]NTP e em sondas de RNA com atividade específica aproximada de 4×10^8 cpm/ μg .

Nucleotídeos marcados de maior atividade específica (por exemplo, 3.000 Ci/mmol) podem ser utilizados, mas, como geralmente são comercializados na concentração de 10 mCi/mL, os mesmos 50 μCi em um volume de reação de 20 μL resultam em menor concentração do nucleotídeo limitante, diminuindo significativamente a síntese de sondas de transcritos completos, a menos que se acrescente nucleotídeo não marcado à reação. Existem produtos comercialmente disponíveis que permitem a síntese de sondas de altíssima atividade específica por meio do uso de vetores com sequências livres de nucleotídeos C e U presentes logo após a sequência promotora, o que diminui significativamente o índice de interrupção de transcrição com o uso de nucleotídeos de alta atividade específica (3.000 ou até 6.000 Ci/mmol), sem necessidade de adição de nucleotídeo não marcado.

As sondas de RNA podem ser separadas do DNA “molde” por meio do tratamento com DNase após a reação de transcrição *in vitro*. A purificação da sonda para a retirada dos nucleotídeos não incorporados pode ser obtida por meio de colunas de Sephadex, precipitação com etanol e acetato de sódio ou cloreto de lítio ou ainda por purificação em gel.

Cálculo da Atividade Específica da Sonda

A quantidade de RNA a ser hibridada dependerá da abundância do mRNA que se está estudando, bem como da atividade específica da sonda, que determina a sensibilidade deste ensaio. Assim, é importante que se saiba calcular a atividade específica da sonda sintetizada e que se seja capaz de modificar as concentrações de nucleotídeo marcado e não marcado para que se obtenham sondas com a atividade específica apropriada para o mRNA que se quer estudar.

Para uma detecção quantitativa do mRNA-alvo, deve haver um excesso molar da ordem de 3 a 10 vezes da sonda em relação ao mRNA-alvo. Em casos de mRNA muito abundantes (como, por exemplo, o de um gene *de controle interno*), 2 a 8×10^4 cpm de uma sonda de alta atividade específica a cada 10 μg de RNA total é suficiente para manter o excesso molar. Para mRNAs considerados abundantes ($> 0,1\%$ do mRNA total), pode-se utilizar aproximadamente 7×10^4 cpm de uma sonda de alta atividade específica a cada 10 μg de RNA total. Com a utilização de sondas de alta atividade específica ($> 3 \times 10^8$ cpm/ μg), pode ser necessário o uso de uma maior quantidade de cpm para se alcançar o excesso molar ideal.

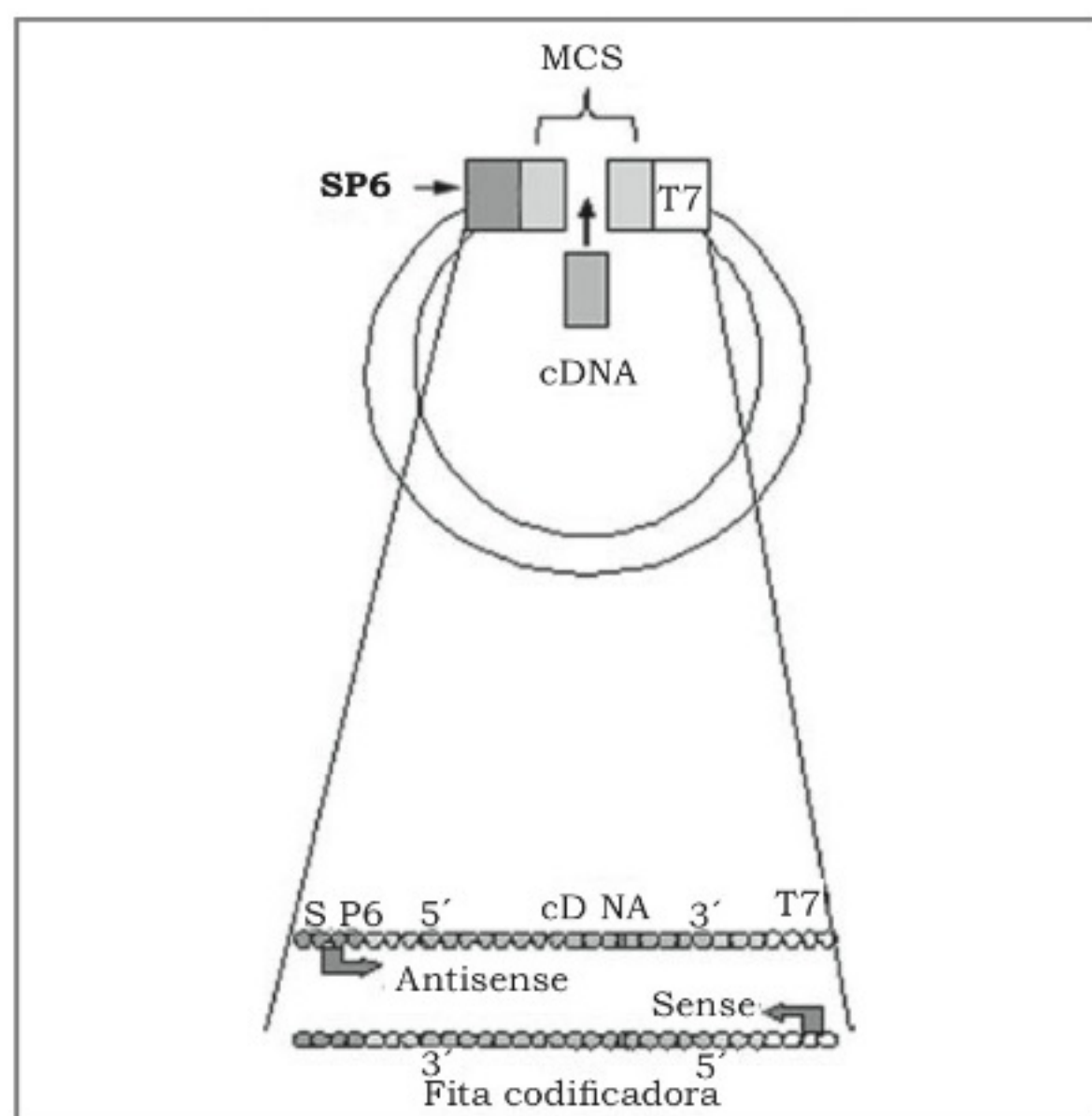


Figura 8.2 – Representação esquemática de um plasmídeo contendo cDNA de um mRNA-alvo flanqueado de cada um dos lados por sequências promotoras para as polimerases dos bacteriófagos SP6 e T7. Pode-se fazer a transcrição *in vitro* para a obtenção da sequência *antisense* (adicionando-se a enzima SP6) ou da sequência *sense* (adicionando-se a enzima T7) após a linearização do plasmídeo por enzimas de restrição. MCS – Multiple Cloning Site.

Pode-se calcular a atividade específica e o rendimento da reação de transcrição conhecendo-se a quantidade de nucleotídeo limitante (marcado e não marcado) adicionada à reação e estabelecendo-se a quantidade de [^{32}P] UTP incorporada ao produto da transcrição (assume-se que a relação de UTP marcado: UTP não marcado incorporada reflita a relação presente na reação). A quantidade de ^{32}P incorporada ao RNA pode ser determinada medindo-se a radiatividade de uma alíquota da reação antes e após a retirada dos nucleotídeos não incorporados (por precipitação com etanol e acetato de sódio ou cloreto de lítio, por coluna de Sephadex ou por purificação em gel). O produto purificado em gel reflete apenas as sondas de transcritos completos, enquanto as outras técnicas refletem também transcritos incompletos.

Dando-se como exemplo a utilização de 5 μL de [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]UTP de atividade específica de 800 Ci/mmol e concentração de 10 mCi/mL e de 2,2 μL de uma solução 50 μM de UTP não marcado em um volume de reação de 20 μL , o cálculo da atividade específica da sonda é feito como se segue.

Cálculo da Quantidade de Radiatividade na Reação

O UTP marcado está em uma concentração de 10 mCi em 1 mL, ou seja, 10 μCi em 1 μL . Assim, nos 5 μL acrescentado tem-se 50 μCi .

Obs.: deve-se ajustar a quantidade de radiatividade pela meia-vida do $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$; assim, se for utilizada uma solução que tem apenas 74,76% da atividade inicial do $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$, nos 5 μL teremos 37,38 μCi .

Cálculo da Quantidade de Moles de [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]UTP na Reação

Sabendo-se que 800 Ci ($8 \times 10^8 \mu\text{Ci}$) = 1 mmol, 50 μCi = 62,5 pmol.

Cálculo da Quantidade de Moles de UTP Não Marcado na Reação

Solução de 50 μM contém 50 pmoles/ μL . Assim, se foram acrescentados 2,2 μL , tem-se uma quantidade total de 110 pmoles.

Cálculo da Quantidade Total de UTP na Reação

62,5 pmoles + 110 pmoles = 172,5 pmoles de UTP (concentração de UTP na reação = 8,6 μM)

Medida da Radiatividade na Alíquota (de 1 μL)

Antes da Retirada dos Nucleotídeos não Incorporados

$$5,8 \times 10^6 \text{ cpm}$$

Medida da Radiatividade na Alíquota (de 1 μL)

Após a Retirada dos Nucleotídeos Não Incorporados

$2,4 \times 10^6 \text{ cpm}$ – assume-se que a eficiência de contagem do isótopo ^{32}P no líquido de cintilação seja 100%.

Proporção de UTP Incorporado ao RNA

$$2,4 \times 10^6 \text{ cpm} / 5,8 \times 10^6 \text{ cpm} = 41\% \text{ de incorporação.}$$

Cálculo do Rendimento Teórico Máximo da Reação

(Quantidade Máxima de RNA que pode Ser Sintetizada)

Assumindo-se que o RNA sintetizado contenha quantidades equimolares dos quatro nucleotídeos (ATP, CTP, GTP e UTP), 172,5 pmoles de cada um dos nucleotídeos foram incorporados. A soma dos pesos moleculares dos 4 ribonucleotídeos é aproximadamente 1.320 Dáltons (o peso molecular médio de um nucleotídeo no RNA é de 330 Dáltons).

$$\frac{1.320 \times 10^{12} \text{ pg} \times 172,5 \text{ pmol}}{10^{12} \text{ pmol}} = 2,27 \times 10^5 \text{ pg} = 0,23 \mu\text{g}$$

Cálculo da Quantidade de RNA Sintetizada:

Rendimento teórico \times porcentagem de incorporação / 100 = μg de RNA sintetizado.

Obs: máximo da reação (em μg)

$$\frac{0,23 \times 41}{100} = 0,094 \mu\text{g}$$

Cálculo da Atividade Específica da Sonda

cpm incorporado ao RNA/ μg de RNA sintetizado = atividade específica (cpm/ μg)

cpm incorporado ao RNA = cpm/ μL após purificação

da sonda \times volume da reação

$$= 2,4 \times 10^6 \text{ cpm} \times 20 \mu\text{L}$$

$$= 4,8 \times 10^7 \text{ cpm}$$

$$\frac{4,8 \times 10^7}{0,094} = 5,1 \times 10^8 \text{ cpm}/\mu\text{g}$$

Problemas na Síntese das Sondas de RNA

As duas principais causas de falha na síntese de sondas de RNA *in vitro* são a utilização de DNA “molde” de má qualidade e a presença de inibidores da transcrição na solução de nucleotídeo marcado. Assim, deve-se assegurar que a preparação de DNA “molde” seja de boa qualidade (trabalhar com amostras de DNA com razão OD_{260/280} entre 1,8 e 1,9) e deve-se evitar o uso de soluções de nucleotídeos [α -³²P] que contenham estabilizantes.

Os reagentes da síntese de transcrição (DTT, tampão de transcrição e nucleotídeos) devem estar à temperatura ambiente antes da adição do vetor contendo o cDNA “molde”, pois a espermidina presente no tampão de transcrição pode precipitar o DNA em baixas temperaturas. Deve-se, ainda, aliquotar a solução estoque de DTT a -20°C para evitar congelamentos e descongelamentos repetidos.

No caso de persistirem problemas na síntese da sonda *antisense*, apesar de todos os cuidados mencionados acima terem sido observados, pode-se tentar melhorar a transcrição diminuindo-se a temperatura da reação, normalmente realizada a 37°C ou à temperatura ambiente, para 16°C ou 4°C, o que lentifica a progressão da polimerase, prevenindo que ela seja deslocada por estruturas secundárias. Caso ainda não se consiga um transcrito de boa qualidade, pode-se tentar trocar a sequência promotora para se utilizar uma outra RNA polimerase, já que as três polimerases normalmente utilizadas podem transcrever sequências diferentes de DNA com várias eficiências. Existem vetores comercialmente disponíveis que contêm as sequências promotoras para as polimerases SP6, T7 e T3 arranjadas lado a lado, nos quais o cDNA de interesse pode ser subclonado.

A síntese de transcritos de RNA incompletos, que aparecem como bandas de tamanhos menores que o esperado (ou “arrastes”), ocorre quando a concentração do nucleotídeo limitante é muito baixa e pode ser contornada aumentando-se sua concentração pela adição de nucleotídeo não marcado.

Uma certa quantidade de quebra dos fragmentos protegidos pode ocorrer, uma vez que a degradação do mRNA ocorre naturalmente nas células, no entanto, se degradação excessiva estiver presente, deve-se verificar a integridade das amostras de RNA por eletroforese em gel de agarose antes de se realizar o próximo ensaio.

Quantificação de Transcritos de mRNA por meio do RPA

As técnicas comumente utilizadas para a quantificação de transcritos de RNA são o *Northern blotting*, a

hibridação *in situ*, o RPA, a reação em cadeia pela polimerase após transcrição reversa do RNA (RT-PCR) e os *arrays* de cDNA.

A análise por *Northern blotting* é a única que fornece informações sobre a integridade das amostras de RNA, o tamanho do mRNA e os processamentos (*splicings*) alternativos, porém, neste ensaio, qualquer degradação do mRNA-alvo resulta em perda total ou parcial do sinal da banda e aparecimento de um arraste no autorradiograma. Em contrapartida, no RPA, o tamanho da banda depende do tamanho da sonda *antisense*, que é geralmente pequena (200 a 500 bases), de forma que degradações do RNA-alvo nas regiões que não se hibridam com a sonda não afetarão o resultado do ensaio. Esta diferença pode ser relevante no estudo de moléculas grandes de RNA. O RPA é utilizado para mapear os sítios de início e término da transcrição, para definir os limites entre íntrons e éxons e para diferenciar entre mRNAs relacionados de tamanhos semelhantes que migram de forma similar no *Northern blotting*. No RPA, existe a possibilidade de utilização de até 100 µg de RNA total para aumentar a sensibilidade do método.

A hibridação *in situ* é o método de maior complexidade e o único que permite a localização dos transcritos em células específicas de determinado tecido. A principal limitação dessas três técnicas é sua baixa sensibilidade em comparação ao RT-PCR, que tem sensibilidade para detectar transcritos de uma única célula. Apesar dessa maior sensibilidade para a detecção de transcritos de mRNAs pouco abundantes, uma quantificação precisa pode ser difícil, necessitando de avaliação na fase exponencial de amplificação, o que limita a sensibilidade e pode ser difícil de otimizar. O RT-PCR competitivo requer a síntese de um competidor cuidadosamente quantificado, e o *real-time* RT-PCR requer o uso de equipamentos especiais que podem não estar disponíveis em muitos laboratórios. O quadro 8.1 compara algumas características do RPA com outras técnicas para a mensuração do mRNA.

Determinação Semiquantitativa

Uma quantificação relativa é obtida comparando-se os níveis do RNA de interesse com um controle interno. Assim, normalizam-se eventuais diferenças decorrentes de heterogeneidade na concentração das amostras ou na aplicação das amostras no gel. O controle interno ideal deve ser um gene de expressão constante nas condições testadas. Genes *housekeeping* normalmente utilizados, tais como β -actina, GAPDH e ciclofilina, podem apresentar variação em sua expressão em diferentes tecidos

ou em várias fases do desenvolvimento e devem ser validados nas condições experimentais que se quer estudar.

Determinação Quantitativa

Uma quantificação absoluta é obtida comparando-se a intensidade do sinal do gene de interesse com uma curva-padrão construída com amostras de RNA *sense* de concentrações conhecidas. O RNA *sense* sintetizado *in vitro* é hibridado com a sonda *antisense* e a curva-padrão assim construída é analisada juntamente com as amostras, para que a intensidade dos sinais obtidos seja comparada diretamente com a curva-padrão.

A quantificação do RNA *sense* deve ser exata para que a curva-padrão seja confiável e pode ser feita tanto pela leitura da absorbância na OD₂₆₀ como pelo cálculo do rendimento da reação da síntese *in vitro* baseado na porcentagem de incorporação de uma pequena quantidade de nucleotídeo marcado adicionado à reação (por exemplo, 1 µL da solução de nucleotídeo marcado diluída 1:10 juntamente com o nucleotídeo não marcado). Devem-se utilizar as mesmas fórmulas usadas para o cálculo do rendimento da reação de síntese da sonda *antisense* e as diluições do RNA *sense* devem ser feitas de forma a incluir a quantidade esperada do mRNA de interesse. De modo geral, para 10 µg de RNA total, a quantidade esperada de um transcrito raro de mRNA está entre 10 fg e 10 pg.

Análise Simultânea de Múltiplos mRNA de Interesse Utilizando-se o RPA

Várias sondas podem ser usadas simultaneamente em um mesmo ensaio para a detecção de diferentes mRNA-alvos, desde que tenham tamanhos diferentes entre si e que, quando utilizadas isoladamente no RPA,

resultem em uma banda única. Podem-se utilizar construções comercialmente disponíveis, algumas capazes de gerar até mais de 10 sondas *antisense*, ou pode-se construir o vetor com as sequências que se quer sintetizar. Neste último caso, o uso de no máximo 6 sondas é recomendável, incluindo um controle interno.

O uso de sondas múltiplas não aumenta apenas a quantidade de dados que se pode obter de um experimento, mas contribui para a melhora da qualidade dos dados, já que reduz a variabilidade interensaio.

Protocolos

Marcação Radiativa do Marcador de Peso Molecular

1. Digestão do plasmídeo pBR322 com a enzima de restrição *Hpa* II – Em 1 tubo de microcentrífuga de 1,5 mL acrescentar:
 - 5 µg de pBR322
 - 2 µL da enzima *Hpa* II
 - 2 µL do tampão da enzima concentrado 10×Completar com H₂O ultrapura para volume final de 20 µL.
Incubar a 37°C por 2 h. Verificar se houve digestão do plasmídeo em 26 fragmentos em gel de agarose. Tamanho dos fragmentos (bp): 622, 527, 404, 309, 242, 238, 217, 201, 190, 180, 160, 160, 147, 147, 123, 110, 90, 76, 67, 34, 34, 26, 26, 15, 9, 9.
2. Em 1 tubo de microcentrífuga de 1,5 mL acrescentar:
 - 1 µg pBR322 cortado com a enzima de restrição *Hpa* II
 - 1 µL de dATP à 2 mM

Quadro 8.1 – Comparação do RPA com outras técnicas para mensurar mRNA em amostras de RNA total.

Características	RPA	<i>Northern blotting</i>	RT-PCR
Análise de vários mRNAs na mesma amostra	Sim	Não	Sim
Sensibilidade (nº de cópias de mRNA detectadas)	10 ⁵	10 ⁶	50-100
Etapas de amplificação presentes	Não	Não	Sim
Complexo	Sim	Sim	Não
Trabalhoso	Sim	Sim	Não
Probabilidade de imprecisão na medição devido a polimorfismo no gene	Alta	Baixa	Baixa

- 1 µL de dGTP à 2 mM
 - 1 µL de dTTP à 2 mM
 - 5 µL de [α -³²P]CTP (800 Ci/mmol, 10 mCi/mL)
 - 1 µL da enzima *klenow*
 - 4 µL do tampão *nick translation* concentrado 10×
- Completar com H₂O ultrapura para volume final de 40 µL.

Incubar à temperatura ambiente (TA) por 30 min.

3. Interromper a reação acrescentando-se 1 µL de EDTA a 0,5 M.
4. Adicionar os seguintes reagentes:
 - 41 µL de fenol Tris-saturado
 - 41 µL de clorofórmio

Misturar por vórtice e centrifugar a 12.500 rpm por 5 min à TA.
5. Transferir a fase aquosa (camada superior) para um novo tubo de 1,5 mL.
6. Proceder à purificação utilizando-se colunas de Sephadex (*Spin columns*) comercialmente disponíveis, seguindo-se as instruções dos fabricantes. Após a centrifugação para obtenção da solução purificada, retira-se 1 µL da solução para a medida da radiatividade na alíquota após a retirada dos nucleotídeos não incorporados.

Síntese da Sonda *Antisense*

1. Em um tubo com capacidade de 1,5 mL acrescentar:
 - 0,8 µL de RNAsin 25 U/µL (inibidor de RNases)
 - 4 µL da solução de ATP, CTP, GTP 2,5 mM*
 - 2 µL de DTT (ditiotretol) 100 mM
 - 4 µL de tampão de transcrição concentrado 5x
 - 1 µL do vetor linearizado contendo a sequência-alvo (≥200 ng)
 - 5 µL de [α -³²P]UTP 800 mCi/mmol, 10mCi/mL
 - 2,2 µL da solução de UTP 50 µM**
 - 1 µL de T7/SP6 RNA polimerase (manter a -20°C até o momento do uso e retornar ao -20°C imediatamente após)

Volume final = 20 µL

Misturar os reagentes, pipetando-os gentilmente e centrifugar o tubo rapidamente:

Incubar a 37°C por 1 hora.

2. Interromper a reação adicionando-se:
 - 1 µL de DNase I (1 µg/µL)
 - 1 µL de VRC (complexo vanidil ribonucleosídeo)
 - 1,5 µL de RNA de levedura (tRNA -5 µg/µL) – omitir este reagente quando se está sintetizando a sonda do controle interno

Misturar os reagentes, centrifugar o tubo rapidamente e incubar a 37°C durante 15 min.
3. Adicionar os seguintes reagentes (na ordem que se segue):
 - 12 µL de fenol Tris-saturado
 - 24 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1)

Misturar por vórtice e centrifugar a 12.500 rpm por 5 min à TA.
4. Transferir aproximadamente 22 µL da fase aquosa (camada superior) para um novo tubo de 1,5 ml e adicionar:
 - 22 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1)

Misturar por vórtice e centrifugar a 12.500 rpm por 2 min à TA.

5. Transferir aproximadamente 20 µL da fase aquosa (camada superior) para um novo tubo de 1,5 mL. Retirar 1 µL e colocar em líquido de cintilação para a contagem em contador β para a medida da radiatividade na alíquota antes da retirada dos nucleotídeos não incorporados. Adicionar aos 19 µL restantes:
 - 1,9 µL de acetato de sódio 3M pH 6,0
 - 1,0 µL de tRNA (omitir este reagente quando se está sintetizando a sonda do controle interno)
 - 50 µL de etanol absoluto gelado

Misturar por inversão e incubar por 30 min a -20°C. Centrifugar o tubo a 12.500 rpm por 30 min a 4°C.
6. Remover cuidadosamente o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 30 µL de H₂O ultrapura estéril. Adicionar:
 - 3,0 µL de acetato de sódio 3M pH 6,0

* 50 µL de ATP (10 mM) + 50 µL de CTP (10 mM) + 50 µL de GTP (10 mM) + 50 µL de água ultrapura.

** 5 µL UTP (10 mM) + 995 µL de H₂O. A quantidade de UTP não marcado a ser acrescentada depende da atividade específica que se quer obter. Caso se utilize um volume menor de UTP não marcado, deve-se completar o volume para 20 µL com H₂O livre de RNase.

– 1,0 μL de tRNA (omitir este reagente quando se está sintetizando a sonda do controle interno)

– 75 μL de etanol absoluto gelado

Misturar por inversão e incubar por 30 min à -20°C . Centrifugar o tubo a 12.500 rpm por 30 min a 4°C .

7. Repetir a etapa 6.

Neste momento, pode-se acertar a temperatura dos banhos-maria ou bloco de aquecimento para 45°C e 85°C .

8. Remover cuidadosamente o sobrenadante. Adicionar ao precipitado 100 μL de etanol a 75%. Misturar por inversão e centrifugar a 12.500 rpm por 10 min a 4°C .

9. Remover cuidadosamente o sobrenadante e secar o precipitado em ar ambiente por 5 a 10 min (não secar a vácuo). Ressuspender o precipitado em 30 μL de água ultrapura livre de RNase (ou tampão de hibridação) e solubilizar o precipitado durante 20 s em uma microcentrífuga.

10. Retirar 1 μL e colocar em líquido de cintilação para a contagem em contador β da medida da radiatividade na alíquota após a retirada dos nucleotídeos não incorporados.

11. Acrescentar o volume de água ultrapura livre de RNase ou tampão de hibridação necessário para se alcançar o volume final que permita a obtenção da quantidade de cpm/ μL desejada (vai depender da abundância do mRNA-alvo. Sugestão: de 120.000 a 200.000 cpm/ μL).

12. Armazenar a sonda a -20°C .

13. Alternativamente à purificação da sonda por precipitação, podem ser utilizadas colunas de Sephadex (*Spin columns*) comercialmente disponíveis, seguindo-se as instruções dos fabricantes (por exemplo: NucAway Spin Columns®, Ambion; Quick Spin Column, Sephadex® G-50 [Fine], Roche). Neste caso, após a extração clorofórmio: álcool isoamílico (etapa 4 do item da síntese da sonda *antisense*), transfere-se aproximadamente 20 μL da fase aquosa (camada superior) para um novo tubo de 1,5 mL e retira-se uma alíquota de 1 μL para a medida da radiatividade na alíquota antes da retirada dos nucleotídeos não incorporados. A seguir, em vez de se realizar a precipitação com acetato de sódio e etanol, procede-se à utilização da coluna.

14. Após a centrifugação na coluna para a obtenção da solução de sonda purificada, retira-se novamente

1 μL da solução para a medida da radiatividade na alíquota após a retirada dos nucleotídeos não incorporados. Acrescenta-se o volume de água ultrapura livre de RNase ou tampão de hibridação necessário para se alcançar o volume final que permita a obtenção da quantidade de cpm/ μL desejada (vai depender da abundância do mRNA-alvo. Sugestão: de 120.000 a 200.000 cpm/ μL).

Hibridação

Recomenda-se que o RNA a ser utilizado seja armazenado em água ultrapura livre de RNase a -70°C . A quantidade de RNA total utilizada dependerá da abundância do mRNA-alvo. Geralmente, utiliza-se de 5 a 20 μg de RNA total, podendo-se utilizar até 100 μg . RNA poli(A) também pode ser utilizado.

1. Preparar o pré-tampão de hibridação concentrado 4 \times :

– 552 μL de H_2O livre de RNase

– 80 μL de Tris 1 M, pH 7,5

– 8 μL de EDTA a 0,5 M, pH 8,0

– 320 μL NaCl, a 5 M

– 40 μL de SDS a 10% (sulfato sódico dodecila)

Armazenar à TA e aquecer a 45°C antes do uso.

2. Preparar o tampão de hibridação:

– formamida deionizada a 75%

– 25% de pré-tampão de hibridação concentrado 4 \times

Para cada amostra de RNA: 22,5 μL de formamida + 7,5 μL de pré-tampão.

Preparo para 20 amostras (cálculo para 22 amostras para compensar eventuais perdas na pipetagem): 495 μL de formamida + 165 μL de pré-tampão.

3. Precipitação da quantidade desejada de RNA total em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL adicionando-se:

– RNA total (idealmente, amostras na concentração de 0,5–1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

Completar o volume para 50 μL com água ultrapura livre de RNase.

– 5 μL de acetato de sódio 3M, pH 6,0

– 125 μL de etanol absoluto

Misturar por inversão e incubar por 1 hora à -70°C . Centrifugar o tubo a 12.500 rpm por 30 min a 4°C .

4. Remover cuidadosamente o sobrenadante e secar o precipitado em ar ambiente por 5 a 10 min.
5. Adicionar 29 μL do tampão de hibridação em cada amostra de RNA, e em um tubo contendo 2 μL da solução de tRNA (controle negativo). Solubilizar o RNA gentilmente com a pipeta e centrifugar rapidamente. Pipetar também 29 μL da solução de hibridação em um tubo vazio.
6. Adicionar 1 μL da(s) sonda(s) diluída(s) em cada uma das amostra de RNA, no tubo contendo tRNA e em outro apenas a solução de hibridação, que será chamado C1.
7. Colocar as amostras em bloco para aquecimento (ou banho-maria) à temperatura de 85°C por 5 min.
8. Incubar por 12 a 16 h à temperatura de 45°C em bloco para aquecimento ou em banho-maria.

Tratamento com RNase e Purificação dos Fragmentos Protegidos

1. Preparar o tampão de digestão com RNase (para 20 amostras):
 - 60 μL de Tris 1 M, pH 7,5
 - 60 μL de EDTA à 0,5 M, pH 8,0
 - 360 μL de NaCl 5 M
 - 5,52 mL de H_2O livre de RNase
 - 24 μL de RNase a 10 mg/mL
 - 3 μL de RNase T1 a 4 mg/mL
2. Remover as amostras de RNA do bloco de aquecimento, centrifugar rapidamente e acrescentar 270 μL do tampão de digestão contendo RNase em cada tubo com as amostras de RNA, de RNA de levedura e no tubo C1 (será usado como controle da digestão: se as RNases estiverem funcionando adequadamente, a sonda será completamente degradada e não haverá bandas).
3. Centrifugar por 10 s e incubar por 1 hora a 30°C. Neste momento, pode-se iniciar a montagem do aparato para eletroforese.
4. Preparar a solução de proteinase K. Para cada amostra será utilizado 20 μL de SDS a 10% e 2,5 μL de proteinase K, 20 mg/mL.
Preparo para 20 amostras (cálculo para 22 amostras para compensar eventuais perdas na pipetagem): 440 μL de SDS a 10% + 55 μL de proteinase K.
Adicionar 22,5 μL da solução de proteinase K a cada tubo e incubar a 37°C por 15 min.
5. Adicionar a cada tubo:
 - 150 μL de fenol Tris-saturado
 - 300 μL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1).
 Homogeneizar por vórtice e centrifugar a 12.500 rpm por 5 min à TA.
6. Retirar cuidadosamente a fase aquosa (camada superior) ajustando o pipetador para 320 μL e transferir para um novo tubo de 1,5 mL. A cada tubo adicionar:
 - 4 μL de tRNA 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
 - 1,5 μL de acetato de sódio 3 M, pH 6,0
 - 700 μL de etanol absoluto gelado
 Misturar os tubos por inversão e incubar por 30 min a -20°C. Centrifugar a 12.500 rpm por 30 min a 4°C.
7. Remover cuidadosamente o sobrenadante e secar o precipitado completamente em ar ambiente (não secar a vácuo).
8. Ressuspender o precipitado em 12,5 μL de **tampão de amostra (item 8a)**, pipetar delicadamente para ressuspender e centrifugar rapidamente.

8a. Tampão de amostra (item 8b)

- 50 μL de água
- 200 μL de pré-tampão de amostra

8b. Pré-tampão de amostra (item 8c) (pode ser feito previamente e armazenado a -20°C)

- 950 μL de formamida
- 20 μL de EDTA a 0,5 M, pH 8,0
- 30 μL de corante

8c. Corante (pode ser feito previamente e armazenado a -20°C)

- 10 mg de *xileno cianol*
- 10 mg de *bromofenol blue*
- 300 μL de água ultrapura

9. Transferir 6,5 μL para um novo tubo de 250 μL .
10. Diluir 1 μL da sonda em um volume de H_2O ultrapura livre de RNase suficiente para atingir uma concentração de aproximadamente 4.000 cpm/ μL . Transferir 1 μL para um novo tubo de 250 μL e acrescentar 5,5 μL de tampão de amostra.

11. Diluir o marcador de peso molecular marcado com [α - 32 P] de forma a atingir uma concentração de aproximadamente 5.000 cpm/ μ L. Transferir 1 μ L para um tubo novo de 250 μ L e acrescentar 5,5 μ L de tampão de amostra.
12. Antes de aplicar as amostras no gel, elas devem ser homogeneizadas pipetando-se gentilmente, centrifugadas rapidamente, aquecidas durante 3 min a 95°C (bloco de aquecimento) e imediatamente colocadas no gelo. Antes da aplicação das amostras, os poços do gel devem ser lavados com uma agulha acoplada a uma seringa, jogando-se o próprio tampão dentro do poço.

Separação dos Fragmentos Protegidos em Gel de Poliacrilamida

1. Solução estoque de acrilamida a 40% (19:1 acrilamida/bisacrilamida):
 - 380 g de acrilamida
 - 20 g de bisacrilamida
 - Completar para 1.000 mL com água ultrapura esteril.
 - Armazenar a 4°C.
2. Solução de poliacrilamida a 8%:
 - 100 mL da solução-estoque de acrilamida a 40%
 - 250 g de ureia
 - 25 mL de TBE (tampão Trisborato-EDTA) concentrado 10×
 - Completar para 500 mL com água ultrapura esteril.
3. Tampão de corrida – TBE concentrado 0,5×:
 - 50 mL de TBE concentrado 10×
 - Completar para 1.000 mL com água ultrapura esteril.
4. Pesquisar persulfato de amônia (PA) em 2 tubos de 1,5 mL:
 - 0,026 g no tubo que será usado no preparo do gel selador
 - 0,036 g no tubo que será usado no preparo do gel de corrida
5. Limpar um jogo de placas de vidro (> 40 cm de comprimento) com água ultrapura e, a seguir, com etanol a 70% e absoluto. A placa de vidro menor deve ser siliconizada (Repel-Silane®, Pharmacia Biotech ou equivalente) para facilitar o descolamento do gel após o término da eletroforese. A seguir, a placa menor deve ser limpa novamente com água ultrapura. Montar as placas com um espaçador de 0,4 mm (Fig. 8.3).
6. Preparar o gel selador em um tubo de 50 mL:
 - Colocar 15 mL da solução de poliacrilamida a 8%.
 - Dissolver 0,026 g de AP em 0,5 mL de água ultrapura e adicionar ao tubo.
 - Acrescentar 75 μ L de TEMED.
 - Misturar e derramar rapidamente no reservatório inferior, onde foi colocada uma tira de papel 3 M.
 - Pressionar as placas de vidro contra o papel por aproximadamente 1 min, até que o gel se solidifique.
 - Apertar os parafusos e aguardar 5 min.
7. Preparar o gel de corrida em um tubo de 50 mL:
 - Colocar 40 mL da solução de poliacrilamida 8%
 - Dissolver 0,036 g de AP em 0,5 mL de água ultrapura e adicionar ao tubo.
 - Acrescentar 14 μ L de TEMED.
 - Misturar e colocar o gel imediatamente entre as placas de vidro com uma seringa de 50 mL, tomando o cuidado de não formar bolhas.
 - Encaixar o pente apropriado entre as placas de vidro, de forma que a parte superior do pente fique aproximadamente 2 mm abaixo da parte superior da placa de vidro maior. Recomenda-se a utilização de pentes com o orifício de 5 mm de largura, e não utilizar pentes do tipo “dente de tubarão”.
 - Aguardar a polimerização do gel por 30 a 60 min.
8. Colocar o gel no suporte e adicionar aproximadamente 950 mL de tampão TBE concentrado 0,5× aos reservatórios superior e inferior.
9. Remover o pente e lavar os orifícios com TBE concentrado 0,5×.
10. Fazer uma pré-corrida a 40 Watts, até que o gel alcance a temperatura de 50°C.
11. Lavar os orifícios novamente com TBE concentrado 0,5× e aplicar as amostras (após terem sido aquecidas a 95°C e colocadas no gelo).
12. Proceder à corrida a 50 Watts por 1 a 2 h (até que primeiro corante-azul de bromofenol – saia e que o segundo corante – xileno cianol – tenha avançado $\frac{3}{4}$ da placa).

13. Desmontar as placas de vidro removendo a placa menor e adsorvendo cuidadosamente o gel a um papel de filtro. Cobrir o gel com plástico tipo *Rolopac*, colocá-lo entre dois papéis de filtro adicionais e secar (no secador de gel) a vácuo por aproximadamente 1 hora a 80°C. O gel seco deve ser colocado juntamente com um filme Kodak X-AR em um cassete contendo uma tela intensificadora e armazenado a -70°C, até a revelação do filme (o tempo de exposição varia de acordo com a abundância do RNA que se está analisando e com a atividade específica da sonda) (Fig. 8.3). Pode-se, ainda, quantificar a radioatividade no *phosphorimaging* ou outro instrumento equivalente.

Kits Comercialmente Disponíveis

Existem *kits* comercialmente disponíveis para a realização da transcrição *in vitro*, tais como:

- *Riboprobe® System Components and Buffers* – Promega.
- *T7 Transcription Kit* – Fermentas.
- *MAXIscript® In Vitro Transcription Kit* – Ambion, que além de sintetizar sondas de RNA marcadas radiativamente, também possibilita a síntese de sondas marcadas de forma não isotópica. A vantagem deste tipo de sonda, além da facilidade de manipulação, é que, por não sofrer radiólise, é estável por 1 ano quando armazenada adequadamente, não havendo a necessidade de síntese a cada RPA. A transcrição *in vitro* é realizada da mesma forma, substituindo-se o nucleotídeo radiativo pelo nucleotídeo modificado (por exemplo: Biotin-14-CTP, Biotin-16-UTP, Digoxigenin-11-UTP, Fluorescein-12-UTP). A detecção da sonda será feita pelo *kit Ambion's BrightStar BioDetect®*.
- *SP6/T7 Transcription Kit* – Roche, que também permite a síntese de sondas marcadas radioativamente e de sondas marcadas de forma não isotópica.
- *In Vitro Transcription Kit* – Pharmingen.
- *Non-Rad In Vitro Transcription Kit* – Pharmingen, empregado para a síntese de sondas marcadas de forma não isotópica;

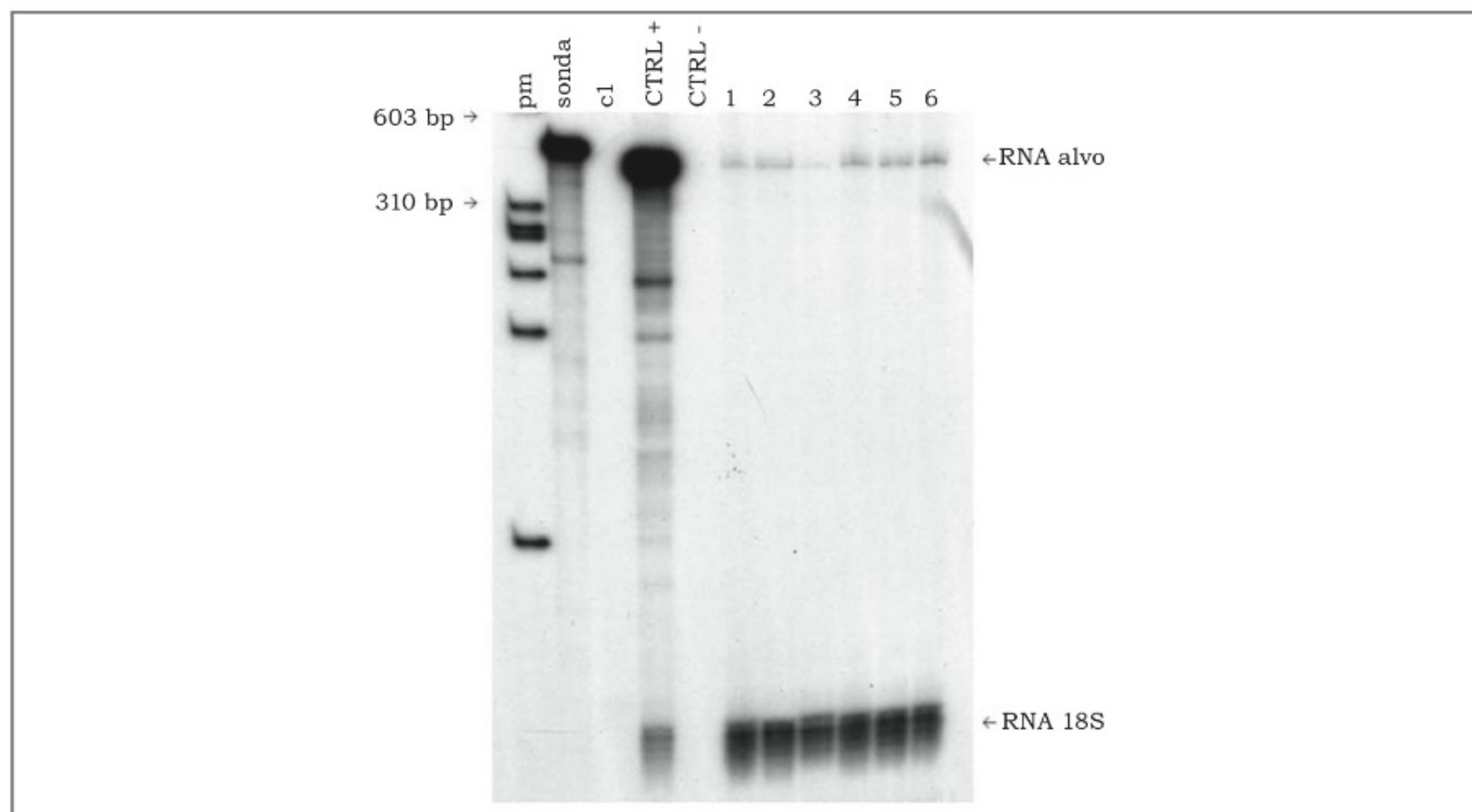


Figura 8.3 – Autorradiografia de um gel de poliacrilamida a 8% após 12 h de exposição demonstrando um ensaio de proteção à ribonuclease. PM: marcador de peso molecular; sonda: 1 µL da solução de sonda na concentração de aproximadamente 4.000 cpm/µL; C1: controle da digestão (quando as RNases estão funcionando adequadamente, a sonda é completamente degradada); CTRL+: controle positivo – 10 µg de um tecido que sabidamente expressa o mRNA de interesse; CTRL -: controle negativo – tRNA de levedura; 1-6: 20 µg de RNA total extraído de células nas condições experimentais testadas. A fração 18 S do RNA ribossômico foi utilizada como controle interno, para uma detecção semiquantitativa. Nota-se que o fragmento protegido apresenta um tamanho menor que o da sonda não hibridada.

Alternativamente à utilização do protocolo para realização do RPA acima descrito, também existem *kits* comercialmente disponíveis das marcas Pharmigen e Ambion. Nos *kits* da Ambion *RPA II*® *Ribonuclease Protection Assay* e *RPA III*® *Ribonuclease Protection Assay*, as etapas da proteinase K e a extração fenol-clorofórmio, que ocorrem após a digestão com RNases, foram abolidas e substituídas por uma única etapa de inativação das RNases simultaneamente com a precipitação do RNA, de forma que todo o procedimento é realizado em um único tubo. O *kit RPA III* é considerado mais sensível que o *RPA II*.

Existe, ainda, um *kit* da marca Ambion que permite a realização do ensaio mais rapidamente (*HybSpeed*® *RPA kit*) e outro que permite a detecção, quantificação e caracterização do RNA direto do lisado celular (*Direct Protect*® *Lysate RPA*).

Referências

- De Leeuw, W.; Slagboom, P.; Vijg J. Quantitative comparison of mRNA levels in mammalian tissues: 28S ribosomal RNA level as an accurate internal control. *Nucleic Acids Res.*, 17:10137 - 10138, 1989.
- Hod, Y. A simplified ribonuclease protection assay. *Biotechniques*, 13:852-854, 1992.
- Ling, M.I.; Risman, S.S.; Klement, I.F.; McGraw, N.; Mcallister, W.T. Abortive initiation by bacteriophage T3 and T7 polymerases under conditions of limiting substrate. *Nucleic Acids Res.*, 17:1605 -1618, 1989.
- Lowe, Jr W.I.; Roberts, Jr C.T.; Iasky, S.R.; Leroith, D. Differential expression of alternative 5' untranslated regions in mRNAs encoding rat insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8946-8950, 1987.
- Melton, D.A.; Krieg, P.A.; Rebagliati, M.R.; Maniatis, T.; Zinn, K.; Green, M. Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.*, 12:7035 - 7056, 1984.
- Parker, R.M.; Barnes, N.M. mRNA: detection by in situ and northern hybridization. *Methods Mol Biol.*, 106:247-283, 1999.
- Rottman, J.B. The ribonuclease protection assay: a powerful tool for the veterinary pathologist. *Vet. Pathol.*, 39:2-9, 2002.
- Sacomanno, C.F.; Bordonaro, M.; Chen, I.S.; Nordstrom, J.I. A faster ribonuclease protection assay. *Biotechniques*, 13:846-850, 1992.
- Schenborn, E.T. *Transcription In Vitro Using Bacteriophage RNA Polymerases*. Human Press Inc., 1995. 1p.
- Schmittgen, T.D.; Zakrajsek, B.A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods*, 46:69-81, 2000.
- Selvey, S.; Thompson, E.W.; Matthaei, K.; Lea, R.A.; Irving, M.G.; Griffiths, L.R. Beta-actin-an unsuitable internal control for RT-PCR. *Mol Cell Probes*, 15:307-311, 2001.
- Spanakis, E. Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls. *Nucleic Acids Res.*, 16:3809-3819, 1993.
- Weis, J.H.; Tan, S.S.; Martin, B.K.; Wittwer, C.T. Detection of rare mRNAs via quantitative RT-PCR. *Trends Genet.*, 8:263-264, 1992.
- <http://www.ambion.com>
- <http://www.promega.com>
- <http://www.fermentas.com>
- <http://www.roche-applied-science.com>
- <http://www.bdbiosciences.com>

9. Sistema de Amplificação de Ácidos Nucleicos pela Reação em Cadeia de Polimerase

Rozangela Verlengia
Estela Bevilacqua
Rosario Dominguez Crespo Hirata
Mário Hiroyuki Hirata

Introdução

A técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) está baseada na replicação (amplificação) enzimática *in vitro* de sequências específicas de DNA (alvo) dirigida por iniciadores oligonucleotídeos (*primers*) que resulta na geração de um número exponencial de cópias dessas sequências.

A PCR consiste de ciclos repetidos de desnaturação do DNA de fita dupla, hibridação dos iniciadores nos alvos de fita simples e síntese da nova cadeia por uma DNA polimerase (Fig. 9.1). A desnaturação do DNA se dá por elevação da temperatura, de forma a converter o ácido nucleico de fita dupla em fita simples. A hibridação dos iniciadores ocorre por pareamento entre as bases nitrogenadas dos iniciadores e as sequências específicas no DNA-alvo. Isso se dá quando a temperatura é diminuída abaixo da temperatura de dissociação dos iniciadores. A síntese da nova cadeia de DNA é realizada por uma DNA polimerase termoestável que incorpora os desoxinucleotídeos trifosfatos na extremidade 3'OH livre no dúplex formado entre o DNA-alvo e o iniciador. A sequência de nucleotídeos da nova cadeia é complementar à sequência-alvo.

Assim, o número de cópias do produto formado aumenta de forma exponencial e pode ser calculado usando a fórmula:

$$\text{DNA-alvo} \times 2^n = \text{produto de PCR (amplicom)}$$

O DNA-alvo refere-se ao número de moléculas de ácido nucleico inicial; n é o número de ciclos da PCR; e produto de PCR corresponde ao número de moléculas produzidas ao final da amplificação. Nos dois primeiros ciclos, os produtos gerados possuem tamanhos variados. A partir do terceiro ciclo são formados os produtos de PCR específicos. Em condições ótimas de reação, uma única molécula de DNA-alvo pode gerar 10^7 moléculas de *amplicons* após 35 ciclos.

Segundo Templeton (1992), em sua revisão sobre a *The polymerase Chain Reaction: History, Methods and Applications*, “a presente tecnologia de PCR é o resultado de uma série de descobertas significativas da pesquisa científica, iniciando com a descoberta da primeira DNA polimerase por Arthur Kornberg em 1955. A DNA polimerase, enzima que sintetiza DNA, foi purificada em 1958. No período compreendido entre 1955 e 1970,

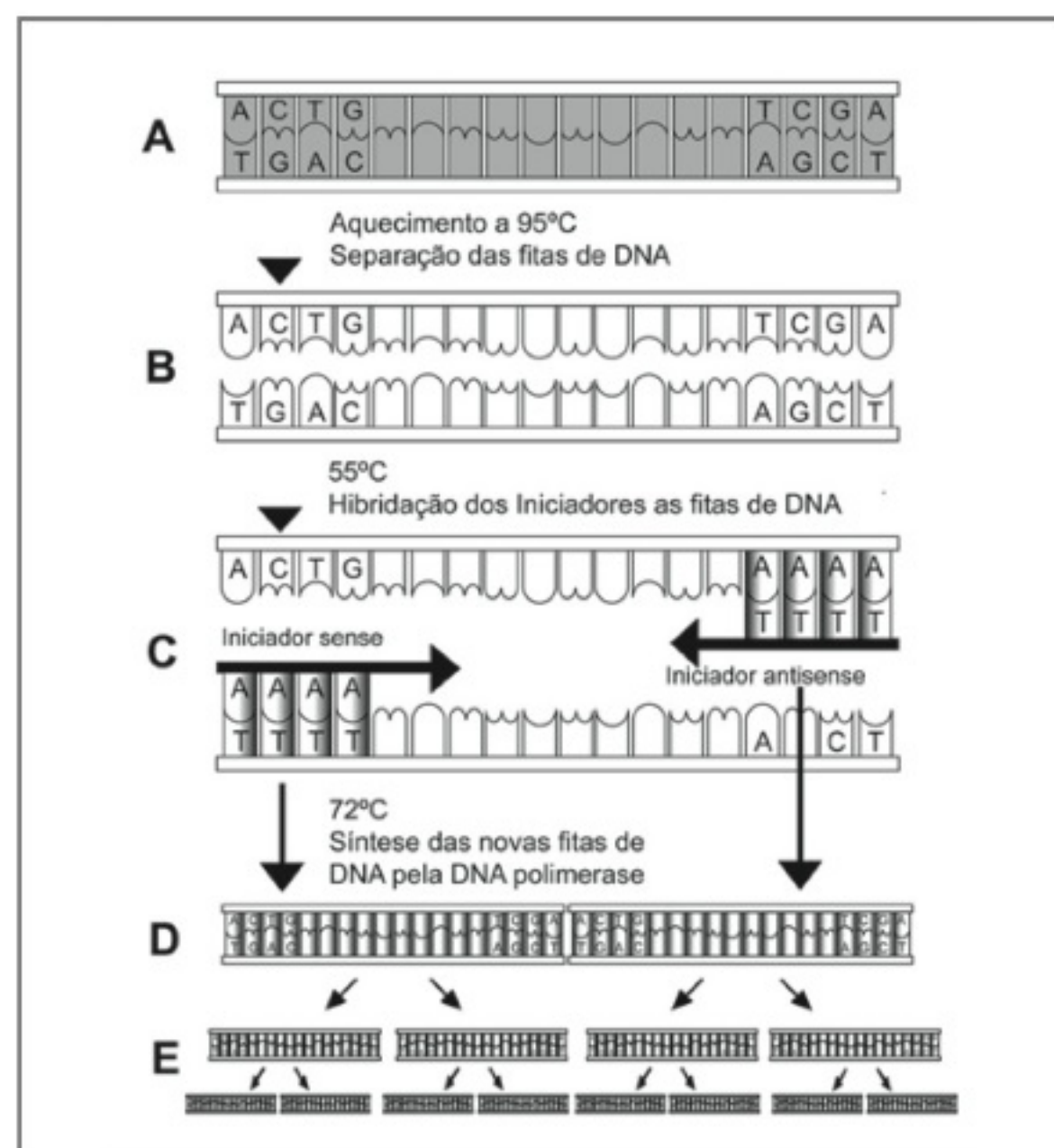


Figura 9.1 – Esquema representativo da Reação em Cadeia pela Polimerase. (A) DNA dupla fita; (B) Desnaturação da dupla fita de DNA em alta temperatura (95°C). (C) Hibridação dos iniciadores *sense* e *antisense* se hibridam às regiões complementares das fitas simples de DNA por diminuição da temperatura. (D) Extensão ou síntese das novas fitas de DNA (incorporação de desoxinucleotídeo trifosfatos) pela DNA polimerase. (E) Ciclos consecutivos de etapas de desnaturação, hibridação dos iniciadores e extensão, com geração de milhares de cópias de um segmento de DNA específico compreendido entre as regiões de hibridação dos iniciadores.

cientistas descreveram a termodinâmica de hibridação do DNA e a extensão de iniciadores na direção 5→3'. A ideia da síntese de DNA *in vitro* foi baseada nos estudos do grupo do Dr Har Gobind Khorana sobre o gene que codifica o tRNA-Ala proveniente de levedura (artigo publicado em 1971). Este estudo apresentava a teoria da PCR em detalhes e denominava a síntese *in vitro* do DNA de "reparo do DNA por replicação".

O primeiro ensaio de PCR foi realizado pelo Dr. Kjell Kleppe. Este procedimento envolveu uma reação com dois ciclos de amplificação de um DNA de fita dupla com 30 nucleotídeos de extensão, usando nove iniciadores com sequências de 10 nucleotídeos (publicado em 1969 na *Gordon Conference on Nucleic Acids*). Entre 1970 e 1972, o mesmo grupo realizou reações utilizando três ciclos de amplificação de sequências de DNA de fita dupla relativamente curtas empregando a enzima DNA polimerase I. A reação foi processada a uma temperatura de 15°C com um tempo de duração de 1 a 2 horas. Grandes quantidades da enzima foram necessárias para a realização da síntese.

Nos anos que se seguiram o alto custo da reação, dificuldades na preparação de enzimas ainda não disponíveis comercialmente (DNA polimerase, polinucleotídeo cinase e DNA ligase) e na análise do DNA levou a uma relativa estagnação no desenvolvimento desta técnica. Por outro lado, na época, a atenção dos cientistas estava principalmente voltada para a clonagem e produção de grandes quantidades de DNA.

A moderna tecnologia da PCR foi desenvolvida para o diagnóstico da anemia falciforme na Cetus Corporation em Emeryville, Califórnia e tornada pública pela primeira vez em 1985, pelo Dr. Kary B. Mullis no 51th Simpósio de Genética Humana da Sociedade Americana (Saiki et al., 1985). Nesta fase, a PCR era realizada empregando-se o fragmento *Klenow* da DNA polimerase I de *Escherichia coli*. Como resultado da baixa temperatura de atividade (37°C) dessa enzima, havia a necessidade da adição da enzima a cada ciclo de desnaturação e, além disto, a formação de produtos inespecíficos durante a etapa de extensão que ocorria a baixas temperaturas (37°C).

Estes aspectos limitaram o uso da técnica de PCR. Subsequentemente, a introdução da DNA polimerase termoestável, enzima isolada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus* (Taq) (Brock; Freeze, 1969) com atividade enzimática ótima a 72°C, impulsionou a utilização da PCR para diferentes finalidades. Esse uso foi possível pelo desenvolvimento concomitante de equipa-

mentos de ciclagem térmica automatizada simples que permitem realizar ensaios de PCR em um único tubo (Saiki, 1988). A disponibilidade de enzimas termoestáveis simplificou o procedimento da PCR e aumentou a especificidade e o rendimento da reação de amplificação. Além disso, produtos de PCR longos puderam ser amplificados a partir do DNA genômico, provavelmente devido à redução na estrutura secundária da fita-molde nas elevadas temperaturas utilizadas para a extensão dos iniciadores. Neste contexto, produtos de até 10 kb puderam ser obtidos com o uso da Taq DNA polimerase e de outras enzimas termoestáveis em vez dos fragmentos com até 400 pb que eram gerados pelo uso do fragmento *Klenow*. Este aspecto contribuiu sobremaneira para a difusão do uso da PCR.

A característica de duplicação exponencial de produtos específicos por meio de ciclos repetidos (desnaturação, hibridação e extensão) confere alta sensibilidade à PCR, possibilitando detectar quantidades da ordem de nanogramas de ácidos nucleicos. A alta especificidade da PCR é conferida pelas sequências dos iniciadores que devem ser previamente estudados utilizando programas de informática de livre acesso ou comercializados. Estas características da PCR associadas às inúmeras modificações e inovações agregadas desde sua descrição original têm ampliado grandemente o campo de aplicação da PCR (Atlas, 1994; Vosberg, 1989; Ferrari, et al., 1996; Lee, Morse, Olisvik, 1997), como apresentado no quadro 9.1.

Cinética da Reação de Amplificação

A cinética de amplificação da PCR apresenta três fases diferentes (McPherson e Møller, 2000): inicial, intermediária e tardia (Fig. 9.2). A fase inicial representa basicamente o momento em que os iniciadores estão interagindo com as sequências de DNA-molde em busca da região complementar. Durante esta fase, os iniciadores ligam-se de forma randômica a sequências complementares e não complementares. Em condições favoráveis, os iniciadores hibridizam-se com maior eficiência às sequências complementares específicas. Essas condições de ensaio devem ser estabelecidas (temperatura, concentração de íons Mg^{2+}) para assegurar a maior especificidade possível do ensaio.

Na fase intermediária da PCR, observa-se uma amplificação exponencial (multiplicação do número) dos produtos de PCR que foram selecionados durante os ciclos iniciais. No decorrer desta fase, a concentração de produtos de PCR gerados é relativamente maior que a

Quadro 9.1 – Aplicações da PCR.

Áreas	Aplicações
Pesquisa e aconselhamento genético	Detecção de mutações, diagnóstico pré-natal de doenças hereditárias, determinação do sexo pré-natal, determinação de polimorfismos populacionais, detecção de marcadores genéticos, produção de sondas para mapeamento de genes e hibridação <i>in situ</i> , genética populacional, Identificação forense de indivíduos, e outras.
Investigação clínica	Detecção e genotipagem de patógenos, identificação de oncogenes ativos e tipagem de tumores, monitoramento de progressão de doenças e terapias, estudos de suscetibilidade a doenças e avaliação pré-clínica de risco, e outras.
Biologia molecular	Sequenciamento de genes, análise e modificação de genes, estudos de expressão gênica, mutagênese de sítio dirigida, e outras.
Outras áreas	Monitoramento de risco ambiental (biossegurança) e outras aplicações.

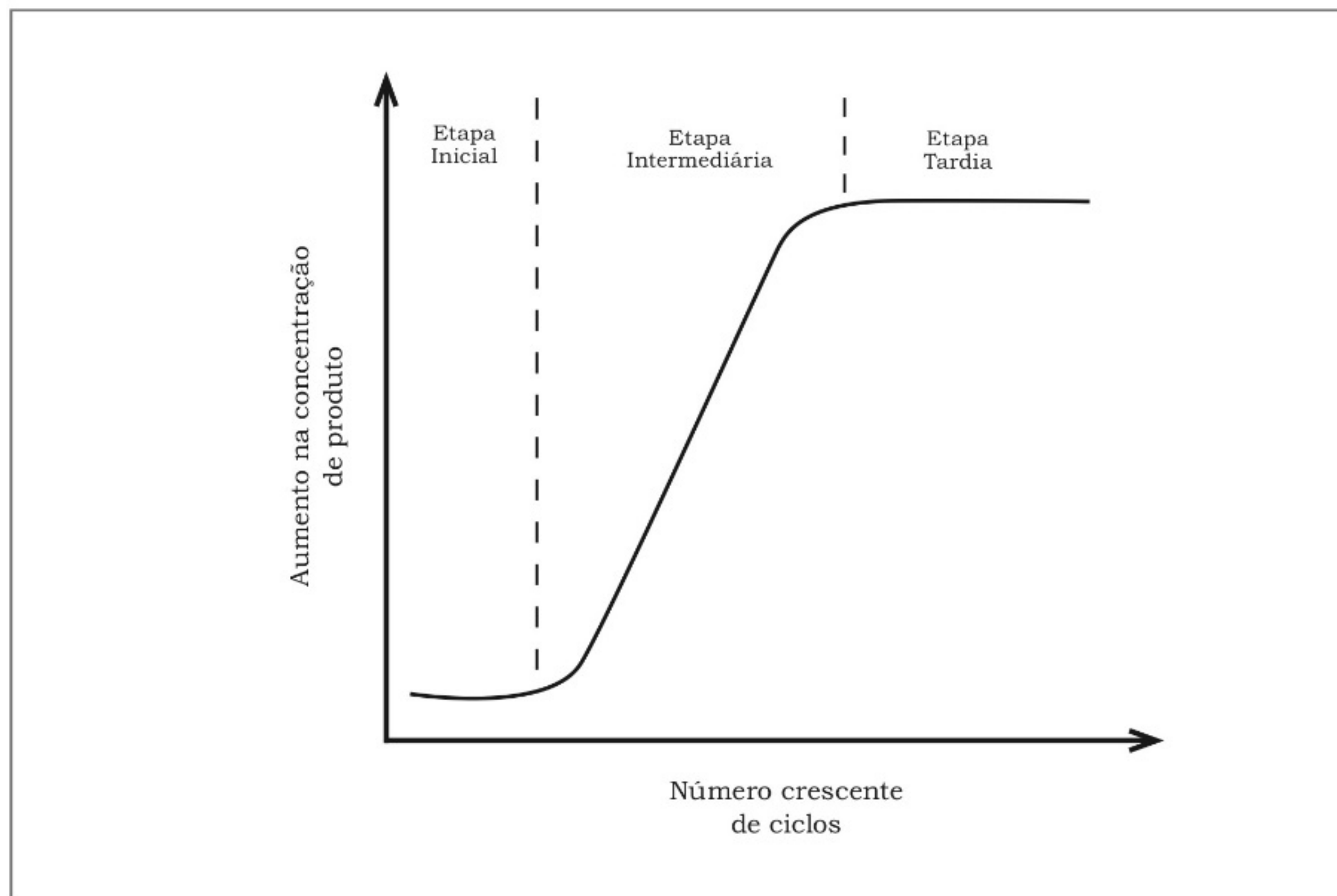


Figura. 9.2 – Cinética da amplificação de DNA por PCR. Na etapa inicial, os iniciadores estão rastreando as sequências complementares do DNA-alvo e ocorre a formação dos primeiros produtos de amplificação. Na etapa intermediária, tem-se a amplificação exponencial dos produtos da PCR. Na etapa tardia, os produtos de amplificação formados acumulam-se resultando na saturação da amplificação. Adaptado de: McPherson, Møller, 2000.

de DNA-alvo. O acúmulo rápido dos produtos ocasiona diminuição da eficiência de amplificação que resulta em um estado de saturação denominado de efeito platô, observado na fase tardia.

A fase tardia ou fase platô compreende a saturação do sistema de amplificação, em que não mais ocorre a relação exponencial entre o número de ciclos e a quantidade de produtos de PCR gerados (Fig. 9.2). Alguns fatores que podem diminuir a taxa de amplificação durante os últimos ciclos, são: 1) consumo dos substratos (iniciadores e dNTPs); 2) estabilidade dos reagentes (dNTPs e enzimas); 3) inibição do produto formado (pirofosfato, DNA de fita dupla); 4) competição entre os reagentes por produtos inespecíficos ou dímeros de iniciadores; 5) re-hibridização de produtos específicos em concentrações superiores a 10^{-8} M (pode diminuir a taxa de extensão ou de processamento da DNA polimerase termoestável ou causar um desvio na amplificação dos produtos originais e liberação dos iniciadores); e 6) desnaturação incompleta do DNA-molde ou dos produtos de PCR gerados quando presentes em altas concentrações.

Um importante fator que determina o aparecimento do efeito platô são baixas concentrações de produtos específicos com a presença de produtos inespecíficos resultantes de pareamentos errôneos dos iniciadores que podem continuar a ser amplificados preferencialmente.

Preparo dos Reagentes

Os componentes (reagentes) essenciais para o desenvolvimento da PCR são: DNA-molde, oligonucleotídeos (iniciadores), DNA polimerase termoestável, desoxirribonucleotídeos (dNTPs), íons de magnésio e tampão de reação.

DNA-Molde

Os ácidos nucleicos a serem avaliados por meio da PCR podem ter origens variadas que incluem tanto amostras biológicas como sangue total, urina, líquido cefalorraquidiano, fezes, esfregaços clínicos, soro, leucócitos purificados, amostras de tecido proveniente de biópsia cirúrgica, raiz de cabelo, esperma, culturas de células e espécimes preservados em parafina, entre outros. Vários protocolos para a obtenção dos ácidos nucleicos a partir de amostras biológicas foram descritos (Lai-Goldman, Lai, Grody, 1988; Williams, Kwok, 1991; White; Madej; Persingt, 1992; Davis; Kuehl, Battey, 1994; Shibata, 1994; Shimizu, Burns, 1995; Quin, 1997; Salazar et al. 1998).

Teoricamente, uma cópia intacta do DNA-alvo pode ser amplificada por PCR. Um maior número de moléculas de DNA-alvo aumenta a probabilidade de uma amplificação bem-sucedida. Quantidades entre 50 ng e 1,0 μ g são usualmente empregadas para gerar número de cópias detectável do gene-alvo. Contudo, algumas impurezas tais como formalina, moléculas contendo grupos heme, heparina, ácido húmico, agentes quelantes de cloreto de magnésio, detergentes e metais pesados (especialmente Fe^{2+} e Fe^{3+}) podem inibir a PCR, sendo necessário eliminá-los ou diluí-los para evitar falsos-negativos.

Oligonucleotídeos Iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) representam sequências de nucleotídeos em fita simples com alta homologia (complementaridade G:C e A:T) aos segmentos que flanqueiam o segmento de ácido nucleico a ser amplificado (Fig. 9.1). As sequências dos iniciadores são selecionadas com o uso de programas computacionais que simulam o ensaio de PCR sob diferentes condições (especificidade, temperatura de hibridização, formação de estruturas secundárias nas sequências dos iniciadores). Para a escolha dos iniciadores, algumas características devem ser consideradas e estão descritas a seguir.

Tamanho do Produto a ser Amplificado

Produtos pequenos de PCR (200-400 pb) são teoricamente mais práticos e fáceis de amplificação em relação a produtos maiores. Isto está relacionado com a eficiência da reação de polimerase (taxa de síntese, ver item DNA polimerase) e com a minimização da formação de estruturas secundárias do amplicon. Além disso, produtos longos são mais suscetíveis à hibridização cruzada com iniciadores e outras sequências gênicas. Produtos de 100 pb ou menores devem ser evitados quando se utiliza o sistema eletroforético para identificação, uma vez que podem ser confundidos com iniciadores e/ou de iniciadores dimerizados (*primer-dimer*). Para análise de ponto de mutação ou polimorfismos de nucleotídeo único, fragmentos de 300-350 pb permitem uma separação eletroforética bem-sucedida dos alelos.

Tamanho dos Iniciadores

Para reações de amplificação de DNA genômico, usualmente os iniciadores devem ser maiores que 17 mer (denominação do comprimento, em número de bases, de um oligonucleotídeo de fita simples [do grego *meros* e que significa parte]). Este critério tem base na probabilidade de a combinação randômica de 17 mer ($4^{17} = 17$ bilhões)

com a sequência genômica total (3 bilhões) ser menor que 1%. Iniciadores de tamanhos menores podem ser utilizados, porém, a especificidade diminui consideravelmente, uma vez que estes oligonucleotídeos podem hibridar com sequências diferentes das esperadas. Por outro lado, iniciadores longos (acima de 30 mer) não aumentam a especificidade e o cálculo da temperatura de dissociação (temperatura de *melting*, T_m , temperatura em que 50% dos iniciadores estão dissociados) torna-se menos confiável. Assim, iniciadores com tamanhos entre 20 e 30 mer são os que fornecem melhores resultados.

Composição de Nucleotídeos

Em geral, uma composição de nucleotídeos com conteúdo balanceado de GC *versus* AT (por exemplo, 45 a 55% GC) e sem segmentos repetidos é recomendável. O conteúdo de GC na extremidade 3' do iniciador também tem um papel importante. Se o conteúdo GC é muito baixo, uma fraca hibridização da região terminal 3' pode diminuir a eficiência de incorporação de nucleotídeos pela DNA polimerase. Por outro lado, um conteúdo GC alto na extremidade 3' pode gerar uma força de hibridação suficiente para iniciar a síntese do produto de PCR, sem que ocorra a hibridização completa do iniciador à sequência-alvo.

Temperatura Ótima de Hibridação

A temperatura de hibridação (temperatura em que ocorre o pareamento mais específico entre as bases do iniciador e as da sequência-alvo) é particularmente importante para determinar a especificidade da reação. Em baixas temperaturas, os iniciadores podem hibridizar-se a sequências similares em alguma parte do genoma, resultando na formação de múltiplos produtos de amplificação. Por outro lado, altas temperaturas de hibridização resultam em condições de alta estrigência para a hibridização do iniciador e consequentemente na formação de produtos específicos. A PCR pode iniciar com baixas temperaturas de hibridização (~ 55°C), nos primeiros ciclos, que podem ser aumentadas em 3 a 5°C, nos ciclos consecutivos, até que a especificidade máxima seja alcançada. Teoricamente, os iniciadores com alto conteúdo de GC requerem altas temperaturas de hibridação para garantir a especificidade do produto. Para o cálculo da temperatura de hibridação ou associação (T_a) um método simples e bastante utilizado baseia-se na soma de 2°C para cada A ou T e 4°C para cada C ou G, ou seja, $T_a = (T_m - 5^\circ\text{C}) = 2(A+T) + 4(G+C) - 5^\circ\text{C}$.

A temperatura de dissociação (T_m) dos iniciadores *sense* e *antisense* deve ser similar ou equivalente entre

si, de modo a evitar falsos pareamentos. Por exemplo, condições muito estrigentes de hibridação do iniciador *sense* ao DNA-alvo desfavorecem a hibridação do iniciador *antisense* e dificultam a geração do produto. Em contraste, condições de baixa estrigência do iniciador *sense* possibilitam a hibridação do iniciador *antisense* a outras sequências do segmento-alvo e ocasionam a geração de produtos inespecíficos.

Estrutura Secundária dos Iniciadores

As hibridizações intramoleculares dos oligonucleotídeos levam à formação de alças que pode inviabilizar sua hibridização com a sequência-alvo. Na seleção dos iniciadores, devem ser evitadas sequências que possibilitem a formação de estruturas secundárias, principalmente para os genes com baixa abundância. Nesse caso, podem-se utilizar altas concentrações de iniciadores para aumentar a probabilidade de ocorrer a hibridização entre este e o segmento alvo, antes de formar a estrutura secundária após cada etapa de desnaturação da reação.

Interações Iniciador-Iniciador

Como a concentração de iniciadores é superior à do DNA-alvo de amplificação, pode ocorrer hibridização entre sequências complementares dos próprios iniciadores, de modo a formar homodímeros (*sense-sense* ou *antisense-antisense*) ou heterodímeros (*sense* e *antisense*). Além disso, a sobreposição (complementaridade) de sequências na extremidade 3' dos iniciadores é também um fator crítico para a formação de dímeros.

Concentração dos Iniciadores

A concentração final recomendada dos iniciadores é de 0,1 a 1 μM , equivalente a uma concentração final entre 5 e 50 pmol de cada iniciador em 50 μL de reação final. Altas concentrações destas moléculas devem ser evitadas porque podem gerar produtos inespecíficos e aumentar a formação de artefatos, como dímeros de iniciadores. Por outro lado, em baixas concentrações, menos moléculas de iniciadores competem pelas sequências-alvo no DNA e menos produtos são gerados no final do processo.

Especificidade da PCR

Embora a amplificação seja dependente da combinação de duas sequências de iniciadores, a especificidade de cada iniciador para evitar a coamplificação de segmentos não desejáveis é crucial para o sucesso da PCR. Isto pode ser avaliado consultando sequências depositadas nos bancos de dados internacionais tais como GenBank® (Gen Bank sequence Database — NIH- <http://>

www.ncbi.nlm.nih.gov/genBank), *European Molecular Biology Database* — EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html>), *Genome Sequence Database* — GSDB (<http://www.ncgr.org/gsdb/gsdb.html>) e *Genome Database* — GDB (<http://www.gdb.org/>).

A partir dos bancos de dados, sequências provenientes de um organismo podem ser comparadas com outras, definindo regiões homólogas ou divergentes entre as espécies. O material genético de alguns organismos já está completamente sequenciado, facilitando a seleção dos iniciadores. Por outro lado, em organismos que possuem o genoma apenas parcialmente sequenciado, os iniciadores selecionados nem sempre são específicos, podendo reconhecer segmentos presentes em mais de um organismo. Devido a este fato, eventualmente, iniciadores podem também resultar em produtos inespecíficos.

A especificidade da reação pode ser aumentada reduzindo-se a concentração dos iniciadores ou de DNA polimerase, minimizando o tempo de hibridização e extensão, ou ainda reduzindo a concentração de cloreto de magnésio (Mg^{2+} livre).

Tipos de Iniciadores

Iniciadores oligoespecíficos — representam sequências homólogas (complementares) às sequências-alvo e podem ser empregados na amplificação de segmentos de ácido nucleicos conhecidos (sequenciados).

Iniciadores com Caudas 5' (5' - Tags) — são iniciadores que carregam na extremidade 5' sequências de nucleotídeos não homólogos ou outras moléculas adicionais. Geralmente tais sequências não interferem com o processo de hibridização do iniciador ao DNA-alvo e podem desempenhar as seguintes funções: 1) inclusão de sítios de restrição por endonucleases para subsequente clonagem; 2) inclusão de sequências que possam funcionar como iniciadores em PCRs secundárias (adaptadores); 3) inclusão de sequências promotoras para a transcrição *in vitro* a partir de produtos de PCR por meio de RNA polimerases (Hayashi, 1994); 4) inclusão de moléculas sinalizadoras, como, por exemplo, fluoróforos, que são úteis na detecção de produtos de PCR em tempo real ou no sequenciamento de DNA.

Iniciador Degenerado — é o iniciador que contém troca de nucleotídeos na sequência (Kwok et al., 1994). Por exemplo, no iniciador GG(CG)A(CTG)A, a terceira posição é C ou G, e a quinta é C, T ou G. O uso de iniciadores degenerados em PCR é um método poderoso para isolar clones de cDNA nos quais somente parte

da sequência de aminoácidos da proteína codificada é conhecida (Lee et al., 1988).

DNA Polimerase

São muitas as propriedades da DNA polimerase na replicação do DNA *in vivo* e *in vitro*, entre elas destacam-se:

Atividade polimerase 5' para 3' — todas as DNA-polimerases usam deoxirribonucleotídeos-5'-trifosfato (dNTPs) para adicionar um desoxirribonucleotídeo-5'-monofosfato à hidroxila da extremidade 3' de um iniciador.

Atividade exonuclease 3' para 5' — a atividade exonuclease 3' → 5' remove um único nucleotídeo por vez, liberando um nucleotídeo 5'-monofosfato. Essa atividade permite a correção da incorporação de nucleotídeos errôneos (*proofreading*) pela DNA polimerase. Na ausência de dNTPs, a atividade exonuclease atua em DNA de fita simples e de fita dupla retirando nucleotídeos a partir da hidroxila livre na extremidade 3', o que não ocorre na presença de dNTPs.

Atividade exonuclease 5' para 3' — Remove um nucleotídeo por vez, liberando predominantemente nucleotídeos-5'-fosfato. No entanto, ocasionalmente pode também liberar oligonucleotídeos longos, acima de 10 nucleotídeos.

Eficiência — a da DNA polimerase depende da capacidade do processamento e da taxa ou velocidade de síntese.

A capacidade de processamento é a medida da afinidade da enzima pela fita de DNA-molde. Quanto maior a interação da DNA polimerase, maior será a capacidade de processamento e maior extensão da sequência de DNA será sintetizada antes de sua dissociação da fita-molde. Após essa dissociação, outra DNA polimerase se ligará ao DNA recém-sintetizado, dando continuidade à síntese. Este processo se repete até a total síntese do DNA.

A taxa de síntese corresponde à capacidade de incorporação de nucleotídeos (nt) por segundo pela DNA polimerase durante a síntese do DNA. Esta taxa varia entre as DNA polimerases que podem incorporar desde 5 a 10 nt s⁻¹ até mais que 100 nt s⁻¹.

Fidelidade na inserção dos nucleotídeos — durante a incorporação dos nucleotídeos pela DNA polimerase, observam-se pareamentos (A:T) e (C:G) errados com frequência de 10⁻⁵ a 10⁻³ por molécula de DNA. Os fatores que contribuem para o pareamento errado são: 1. tipo de nucleotídeos incorporado, as transições "G(iniciador)•T" são mais facilmente formadas do que

as transversões “C•C” e “G•G”; 2. capacidade de identificação do nucleotídeo pela DNA polimerase; e 3. sequência de nucleotídeos onde o pareamento ocorre. Por outro lado, os fatores que estão envolvidos no reconhecimento da incorporação de bases alteradas pela polimerase são: 1. diferenças na estabilidade de ligação dos substratos nucleotídicos pareados e não pareados pelo complexo polimerase-DNA; 2. alterações conformacionais da enzima que permitem o escape preferencial de substratos (dNTPs) ligados incorretamente; e 3. diferenças na taxa de catálise para a formação de ligações fósforo-diéster correta e incorreta.

Atualmente, muitas DNAs polimerases estão disponíveis comercialmente, cada qual com propriedades peculiares, as quais podem ser exploradas para uma grande variedade de aplicações (mais detalhes em **Aplicações** ver: Abramson, 1995; McPherson; Møller, 2000).

A concentração recomendada da enzima varia entre 1 U e 5 U para um volume final de 100 µL por reação. A concentração ótima da enzima pode ser obtida testando diferentes concentrações seguidas dos resultados em gel de eletroforese.

Concentrações muito baixas de DNA polimerase podem gerar quantidade insuficiente do produto de PCR. Enquanto altas concentrações da enzima resultam em maior quantidade de produto de PCR mas, entretanto, também podem aumentar a taxa de síntese de produtos intermediários e/ou inespecíficos formados nos primeiros ciclos da PCR.

Desoxinucleotídeos

Os desoxinucleotídeos (dNTPs) são os substratos incorporados durante a síntese dos produtos de PCR. A concentração de dNTPs deverá ser de 20 a 200 µM na reação final para reduzir a probabilidade de pareamento, errôneo e garantir alta fidelidade durante a incorporação na molécula a ser sintetizada. Os quatro dNTPs (dATP, dTTP, dGTP e dGTP) deverão ser utilizados em concentrações equivalentes, de modo a minimizar incorporações incorretas das bases. Uma concentração final de dNTPs superior a 50 mM na PCR inibe a *Taq* DNA polimerase. A concentração deve ser a menor possível, de modo a garantir a síntese da sequência-alvo e minimizar o pareamento incorreto em regiões não alvos, bem como reduzir a probabilidade de erro na incorporação de nucleotídeos durante a extensão (fidelidade). Por exemplo, 20 µM de cada dNTP, em uma reação de 100 µL, são teoricamente

suficientes para sintetizar 2,6 µg de uma sequência de 400 pb (Atlas, Bej, 1994). As soluções de dNTPs podem ser obtidas comercialmente de forma isolada ou já misturadas (4 nucleotídeos juntos).

Íons Magnésio

A DNA polimerase requer íons divalentes de magnésio (Mg^{2+}) como cofatores enzimáticos. A concentração destes íons afeta a hibridação dos iniciadores a sequência-alvo, a T_m , a atividade e a fidelidade de incorporação dos dNTPs da DNA polimerase (menor taxa de erro). Usualmente, concentrações entre 1,5 mM e 4 mM de $MgCl_2$ são utilizadas nos ensaios de PCR para aumentar a especificidade e a quantidade de produtos formados. A concentração ótima de Mg^{2+} deve ser determinada para cada par de iniciadores.

É importante salientar que a concentração de Mg^{2+} é afetada pela concentração de dNTPs, pois na PCR há ligação equimolar entre dNTPs e Mg^{2+} . Segundo Atlas e Bej (1994), os ensaios de PCR devem conter de 0,5 a 2,5 mM de magnésio a mais que a concentração total de dNTPs. Segundo McPherson e Møller (2000), para a concentração de $MgCl_2$ de 1,5 mM (1.500 µM), se a concentração de cada dNTP for de 200 µM a concentração total de dNTP é de 800 µM. A concentração de Mg^{2+} livre será de 700 µM (1.500 µM de Mg^{2+} – 800 µM de dNTP). Esta concentração está significativamente abaixo da concentração ótima requerida pela *Taq* DNA polimerase. Contudo, se a concentração de cada dNTP for de 50 µM, a concentração total de cada dNTP é 200 µM e a concentração de Mg^{2+} livre será de 1.300 µM (1.500 µM de Mg^{2+} – 200 µM de dNTP) que representa uma concentração ótima para a *Taq* DNA polimerase. Por outro lado, a presença de ácido etileno-diaminotetracético (EDTA) ou outros agentes quelantes na reação pode interferir com a concentração de Mg^{2+} .

Tampão de Reação

A presença de um tampão adequado também é necessária para a reação de PCR. O tampão recomendado tem Tris-HCl 10 a 50 mM (pH 8,3 a 8,9). Também contém KCl 50 mM que facilita a hibridação dos iniciadores. Concentrações superiores a esta podem inibir completamente a atividade de DNA polimerase. A maioria das DNAs polimerases disponíveis no mercado são fornecidas com o tampão específico cuja composição, no entanto, pode variar de acordo com o fabricante para otimizar as condições da reação.

Alguns tampões contêm também detergentes iônicos (Tween 20, Triton X-100, Nonidet P-40) e gelatina ou albumina sérica bovina (100 µg/mL) para estabilizar a DNA polimerase na reação final quando a enzima está diluída abaixo de 1 U/100 µL.

Cossolventes

Cossolventes, tais como glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) e formamida, podem ser utilizados para eliminar artefatos (formação de bandas inespecíficas) da PCR, bem como auxiliar na amplificação de moldes de DNA que contenham alto conteúdo de G e C e que geralmente não desnaturam completamente, impedindo a hibridização dos iniciadores às sequências-alvo. Desta forma, os cossolventes promovem condições de alta estringência para hibridização do iniciador ao DNA-molde. Estes produtos químicos podem também afetar a termoestabilidade da DNA polimerase. Formamida a 5% ou glicerol a 10% podem diminuir o ponto de temperatura de desnaturação em 6,2°C (Landre, Gelfand, Watson, 1995).

Condições dos Ensaios de PCR

Tipicamente, a PCR é realizada em ciclos repetidos de temperaturas variáveis para as etapas de desnaturação, hibridização e extensão. A escolha das temperaturas adequadas é essencial para manter a estringência requerida para a hibridização dos iniciadores às sequências-alvo e garantir as condições ótimas para a desnaturação e a extensão do DNA de fita dupla.

Desnaturação

Geralmente, a desnaturação do DNA-alvo é realizada durante 3 a 5 minutos, antes do primeiro ciclo, utilizando-se temperaturas entre 94°C - 95°C. Nos demais ciclos, a temperatura de desnaturação (94°C - 95°C) é mantida por 30 a 60 s. A seleção da temperatura e tempo de desnaturação depende da extensão e quantidade de G e de C na sequência-alvo. Temperaturas baixas nessa fase podem resultar em desnaturação incompleta da fita dupla-alvo e/ou do produto de PCR e, conseqüentemente, resultados negativos. Resultados negativos também podem ocorrer se as temperaturas de desnaturação são altas e/ou longas, pois levam à perda da atividade enzimática da DNA polimerase mais rapidamente.

Hibridização

A etapa de hibridização compreende a interação dos iniciadores com as sequências-alvo por complementariedade das bases. O processamento desta etapa envolve

a utilização de temperaturas adequadas obtidas a partir das sequências dos iniciadores (ver item Temperatura ótima de hibridização).

Extensão

O tempo de extensão depende do tamanho e número de cópias do DNA-alvo e da temperatura usada na etapa de síntese dos produtos de PCR. A atividade da *Taq* DNA polimerase varia em duas ordens de magnitude entre temperaturas de extensão de 20 e 85°C. A temperatura de extensão dos iniciadores mais utilizada é de 72°C, sendo esta a ideal para a atividade máxima da *Taq* DNA polimerase.

Para amplificação de produtos maiores que 1 kb do DNA-alvo, a fase de extensão dos iniciadores pode ser realizada por 1 a 7 minutos, de acordo com o tamanho da sequência a ser amplificada. Com o tempo de extensão muito longo, agentes como gelatina ou albumina sérica bovina devem ser adicionados à solução tampão da reação para aumentar a atividade e estabilidade da *Taq* DNA polimerase.

Otimização da PCR

Vários parâmetros devem ser otimizados na PCR para garantir alta especificidade dos produtos gerados e alta sensibilidade do sinal de amplificação. Dentre eles destacam-se: concentração de íons Mg^{2+} , temperatura de hibridização dos iniciadores, concentração de dNTPs, presença ou não de cossolventes e número de ciclos.

O número de ciclos é particularmente importante, uma vez que afeta tanto a sensibilidade como a especificidade da PCR. Para baixo número de cópias de DNA-alvo, é preciso utilizar maior número de ciclos, enquanto muitos ciclos favorecem a geração de produtos inespecíficos. Além disso, acima de determinado número de ciclos, o sinal do produto de PCR não aumenta com o número de ciclos, e o que se observa é uma interrupção na formação do produto amplificado específico (mais detalhes ver item Cinética da reação de amplificação).

Números de Ciclos

O número ótimo de ciclos depende principalmente da concentração do DNA-alvo, quando outros parâmetros são otimizados. O número máximo usualmente é inferior a 40 ciclos. Segundo Innis e Gelfand (1990), Kary Mullis comentou "Se você tem que fazer mais do que 40 ciclos para amplificar uma única cópia de gene há algo de errado com o seu PCR". Um número tão elevado de ciclos pode aumentar a quantidade e a com-

plexidade de produtos inespecíficos gerados, reduzindo a especificidade da reação. Por outro lado, números baixos de ciclos podem resultar em uma pequena quantidade de produto amplificado e/ou sua ausência reduzindo a sensibilidade do ensaio.

Análise Confirmatória do Produto Amplificado

Várias técnicas são empregadas para avaliar o produto amplificado, incluindo eletroforese, digestão enzimática (endonucleases), *blotting*, emissão de fluorescência, sequenciamento, espectrometria de massa e outras (Neumaier, Braun, Wagener, 1998). O mais comum é visualizar o tamanho do produto de amplificação após separação eletroforética em géis de agarose ou poliacrilamida, corados com brometo de etídio, SYBR Gold®, ou nitrato de prata. O tamanho de um produto de PCR pode ser estimado conhecendo-se a posição dos sítios de hibridização dos iniciadores nas sequências-alvo e determinado por comparação com marcadores de tamanho molecular de DNA conhecidos.

Na figura 9.3 são apresentados os produtos de PCR separados por gel de agarose corado com brometo de etídio (3A) e as absorbâncias correspondentes aos ciclos de amplificação (B) compreendidos na fase exponencial de amplificação para o gene transportador monocarboxilado do lactato-1 (*MTC-1*) em coração de camundongos.

Fatores que Influenciam na Eficiência da PCR

Dímeros de Iniciadores

Os dímeros de iniciadores representam produtos da extensão do próprio iniciador ou hibridado a outro iniciador durante a reação da PCR. Considerando que estes produtos possuem uma ou ambas as sequências dos iniciadores e sequências complementares, tornam-se alvos de amplificações. E por serem pouco extensos, estes são amplificados com muita eficiência e podem competir pelos iniciadores com as moléculas-alvo de interesse a serem amplificadas. Para evitar ou minimizar este artefato, a seleção dos iniciadores deve ser cuidadosa, procurando-se evitar a construção de iniciadores com extremidades 3' homólogas. O controle da formação de dímeros deve ser realizado por meio de PCRs, nas quais os iniciadores estão presentes, mas na ausência da molécula-molde de cDNA. Este procedimento poderá ser acompanhado em gel de agarose de alta resolução.

Recombinação entre Dois Produtos de PCR Distintos

Ocasionalmente, pode ocorrer a amplificação de produtos inadequados pela PCR quando genes diferentes compartilham homologia suficiente para hibridização mútua durante os primeiros ciclos da reação. Neste contexto, pode aparecer um fragmento amplificado adicional no produto final esperado, principalmente quando muitos ciclos de amplificação são utilizados. É

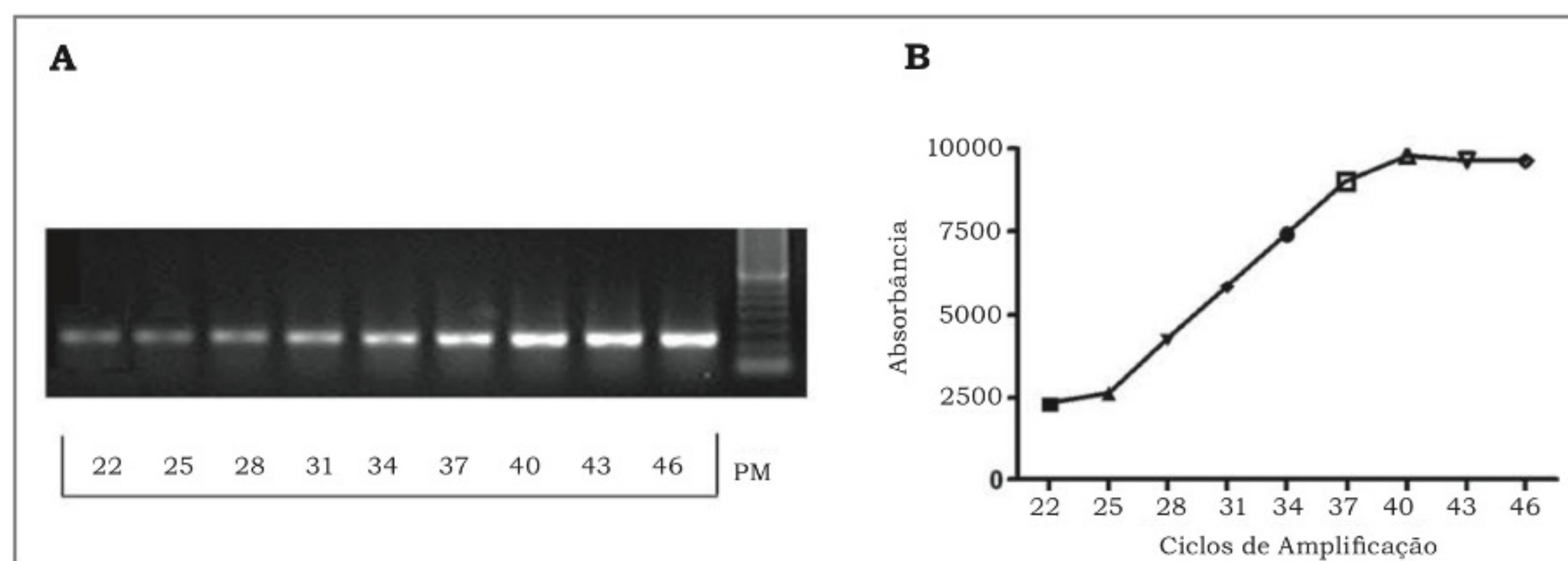


Figura 9.3 – Produtos de amplificação do gene MTC-1 utilizando-se RNA total (2 µg) para conversão em cDNA pela RT gerados em diferentes ciclos de amplificação. (A) Perfil eletroforético do fragmento de MCT-1 amplificado. (B) Representação gráfica da cinética de amplificação do gene MTC-1 em função da quantificação densitométrica das bandas eletroforéticas nos diferentes ciclos utilizados. A fase intermediária compreende os ciclos 26 a 37 e a fase tardia inicia-se no ciclo 40 (Cortesia Dra. Rozangela Verlengia). PM, marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp.

importante estar atento a esta possibilidade que pode gerar moléculas que não são representativas dos genes ou RNAs pesquisados.

Produto de PCR de Fita Simples

A amplificação linear assimétrica de sequências-molde pode ocorrer durante os últimos ciclos da PCR. Esse evento é observado quando há um desequilíbrio no consumo dos iniciadores *sense* e *antisense*. Neste caso, a cada ciclo formam-se produtos de fita simples e de fita dupla. A síntese do produto de fita simples acumula-se em progressão aritmética, enquanto o de fita dupla segue um padrão de amplificação em progressão geométrica.

Quando o produto amplificado é analisado por eletroforese em gel de agarose, o produto de DNA de fita simples aparece como uma banda de migração adicional que migra mais rápido do que o produto de fita dupla. Esta propriedade da PCR, que permite a geração de moldes de fita simples, pode ser utilizada para o sequenciamento de produtos de PCR ou ainda para a preparação de sondas específicas. Para otimizar a formação de um produto de fita simples, pode-se utilizar a razão 10:1 entre os iniciadores.

Contaminação

Devido à alta sensibilidade da técnica de PCR, o risco de contaminação das moléculas-molde com moléculas não desejadas (produto de clonagem, produtos de amplificação prévia – *amplicons*, entre outros) é potencialmente relevante, reduzindo a fidelidade dos resultados. Desta forma, é importante que mecanismos de controle da contaminação sejam considerados durante a PCR, tais como áreas isoladas para o preparo das amostras, para o preparo de reagentes e adição de amostras e também para a análise dos resultados pós-PCR. Além disso, o laboratório deve ter mecanismos de descontaminação, utilizando agentes físicos (UV) e reagentes químicos para a esterilização das áreas e superfícies do laboratório. Contudo, é importante destacar que, em paralelo às reações de amplificação de um gene específico, deve ser realizado controle negativo para verificar possíveis contaminações de moléculas de DNA que não as de interesse. Neste caso, utilizam-se os reagentes necessários à amplificação (H_2O ultrapura, dNTPs, $MgCl_2$, tampão da enzima DNA polimerase, DNA polimerase, iniciadores *sense* e *antisense*) na ausência da amostra-molde (mais detalhes ver Capítulo 11).

Também é importante verificar se ocorre a amplificação de DNA genômico na amostra de RNA em estudo, utilizando-se tratamento específico com DNases em experimentos controle.

Eficiência Relativa da PCR

A PCR sistematiza um processo biológico; similarmente aos processos *in vivo*, a eficiência da reação é menor que 100% (eficiência relativa). Este aspecto é de extrema importância para as análises de quantificação dos ácidos nucleicos. Neste contexto, o termo “eficiência relativa da PCR” é utilizado para descrever a eficiência total do processo de amplificação avaliado ao longo do número total de ciclos da PCR.

Nos ciclos iniciais, nos quais o número de moléculas-alvo disponíveis é relativamente baixo em comparação com o número total da população de ácido nucleico na mistura, a eficiência da PCR é baixa. Similarmente, nos últimos ciclos, quando o número de produtos de amplificação é muito alto e a concentração de iniciadores não hibridizados é limitada, a amplificação esperada da PCR também é de baixa eficiência. Assim, a amplificação da PCR é mais eficiente durante os ciclos intermediários do processo, intervalo em que existe uma disponibilidade significativa de moléculas-alvo, iniciadores, enzimas e dNTPs, entre outros, resultando na síntese exponencial de novas moléculas do produto da PCR.

Dessa forma, quando o objetivo da análise é a quantificação e/ou a semiquantificação, é necessário avaliar a eficiência relativa da PCR. Esse dado pode ser obtido pela determinação do número de moléculas de DNA-alvo adicionado na reação ou do número de moléculas de produtos gerados na amplificação.

Dentre os possíveis métodos utilizados com esta finalidade, os mais comuns são: 1. o uso de ensaios ligação-corante fluorescente; 2. estimativa espectrofotométrica do conteúdo de ácido nucleico; 3. estimativa da quantidade de ácido nucleico a partir do gel de agarose. Um importante ponto é que a eficiência relativa da PCR deve ser avaliada antes do início da fase platô, que precisa ser determinada experimentalmente. Este ponto define o limite superior do intervalo de quantificação linear para uma PCR quantitativa confiável. A eficiência relativa da PCR para uma amplificação específica é influenciada principalmente pela purificação da amostra durante o processo de extração e pelo tamanho e estrutura secundária da molécula de ácido nucleico-alvo.

RT-PCR

A enzima transcriptase reversa (RT), produzida por retrovírus, pode ser utilizada *in vitro* para sintetizar moléculas de DNA complementar (cDNA) a partir de RNA. Historicamente, esta enzima foi primeiro usada para transcrever mRNA em cDNA que pode então ser

clonado em vetores para outras manipulações. Durante o ciclo de vida de um retrovírus, esta enzima desempenha também outras importantes funções, o que inclui a hidrólise do RNA a partir do híbrido RNA-DNA e a cópia de DNA de fita simples para a formação do DNA de fita dupla. As propriedades funcionais da RT são apresentadas no quadro 9.2.

Reações RT-PCR para amplificar sequências de RNA a partir de cDNA foram inicialmente utilizadas para estudar pontos de mutação no gene da ornitina transcarbamilase a partir de segmentos amplificados do mRNA (Veres et al., 1987). O emprego desta técnica permite a detecção e quantificação da expressão de genes, produção de cDNA para clonagem e diagnóstico de agentes infecciosos ou doenças genéticas, entre outros (Chelly, Kahn, 1994; Myers, Sigua, 1995).

Para a síntese do cDNA *in vitro* por meio da reação de RT-PCR, empregam-se geralmente dois tipos diferentes de DNA polimerases dependentes de RNA, a AMV derivada do retrovírus aviário que induz a mieloblastose (*Avian Myeloblastosis Retrovirus*) e a MMLV derivada do retrovírus *Moloney* de camundongo (*Moloney murine leukemia*). A AMV é uma molécula heterodimérica contendo duas subunidades: α (aproximadamente 63 kb) e β (aproximadamente 95 kb). A subunidade- α expressa atividade 5'-3' DNA polimerase dependente de RNA, 5'-3' DNA polimerase dependente de DNA e RNase H (Das et al., 2001).

A MMLV é um polipeptídeo de 84 kD, com atividade polimerase localizada no aminoácido terminal e atividade RNase H no terminal carboxílico. Erros na inserção dos nucleotídeos durante a transcrição não podem ser corrigidos por meio da RT, porque estas enzimas não apresentam atividade exonuclease 3'-5', necessária para a correção (*proofreading*) (Kotewicz, et al., 1985; Das, et al., 2001).

Uma das limitações em relação a estas RTs é que elas possuem baixa capacidade de processamento, em média de 5-15 nucleotídeos por segundo. A formação de produtos truncados por meio das RT-RNase H⁺ parece ser o resultado da pausa da RT sobre o molde de RNA, levando à degradação do RNA por atividade RNase. Isto justifica a maior eficiência da RT na síntese de cDNA completos em condições em que ocorre a redução da atividade RNase H, encontrada na MMLV ou com o uso de MMLV geneticamente modificada e destituída de atividade RNase H (como é o caso da SuperScript II MMLV RNase H).

As RTs AMV e MMLV apresentam atividade enzimática ótima entre 37°C e 42°C, respectivamente. Nestas temperaturas, ocorrem diminuição da especificidade de ligação dos iniciadores com as moléculas-molde e aumento na estabilidade do RNA de fita dupla, o que contribui para aumentar a variabilidade entre ensaios de síntese de cDNA. Para minimizar este problema, pode-

Quadro 9.2 – Propriedades funcionais da transcriptase reversa.

Propriedade	Função
Atividade de DNA polimerase –RNA dependente	Promove a síntese de cDNA utilizando moldes de RNA associados a iniciadores formados por deoxioligonucleotídeos. A enzima é relativamente lenta e incapaz de se desacoplar da fita, tem baixa afinidade por dNTPs e requer concentrações da ordem de milimolar para produzir eficientemente produtos de cDNA longos
Atividade de DNA polimerase –DNA dependente	Promove a síntese de DNA a partir de moldes de DNA ou RNA/DNA usando uma sequência própria de iniciadores do tipo <i>snaphack</i> , iniciadores desoxioligonucleotídeos exógenos, ou pequenos fragmentos de RNA que atuam como iniciadores
Atividade de RNase H	Funciona como uma exonuclease, removendo nucleotídeos a partir das extremidades 5' ou da 3' do RNA presente em uma molécula híbrida RNA/DNA

-se utilizar RT termoativa que apresenta atividade em temperaturas mais altas e permite o aumento na especificidade de ligação do iniciador e a redução da formação de estruturas secundárias no molde de RNA, diminuindo a finalização prematura da síntese de cDNA pela RT.

A DNA polimerase recombinante proveniente da eubactéria termofílica *Thermus thermophilus* (rTth pol) possui atividade RT eficiente na presença de manganês (Mn^{2+}). Com o uso desta enzima, é possível acoplar os dois passos da RT-PCR (síntese de cDNA e amplificação) em um único processo, minimizando possíveis contaminações em análises de agentes infecciosos.

A ThermoScript™ representa outra RT termoes-tável, derivada a partir do clone do vírus mieloblasto aviário (AMV) com pontos de mutação que reduzem a atividade RNase H. Além disto, esta enzima é estável em temperaturas acima de 70°C.

Oligonucleotídeos Iniciadores

Os oligonucleotídeos rotineiramente empregados na reação de transcrição reversa são:

Oligo (dT) – representam sequências de desoxitimidilato trifostato que durante a reação hibridizam-se à cauda poli-A presente na extremidade 3' do mRNA eucariótico. O uso de oligo (dT) é indicado para a amplificação de fragmentos de cDNAs completos (Fox, Nathan, 1997) e permite a formação de cDNAs exclusivamente a partir dos diferentes mRNA constituintes da amostra biológica em análise.

Oligonucleotídeos randômicos – usualmente, são empregadas sequências contendo seis nucleotídeos, denominadas hexâmeros randômicos ou hexanucleotídeos d(N)₆. Por serem sequências curtas, não apresentam homologia com segmentos da molécula-molde, mas podem hibridizar-se em diferentes pontos da molécula de RNA se houver complementariedade. Diferentemente dos iniciadores oligo (dT), neste caso, tem-se formação de moléculas de cDNA correspondentes aos diferentes tipos de RNAs (mRNA, rRNA) presentes na amostra em análise. São comumente utilizados quando não se conhece a sequência de RNA ou em casos em que há excesso de estruturas secundárias no RNA.

Iniciador oligoespecífico antisense – representa sequências de 15 a 30 nucleotídeos que hibridizam em regiões específicas da extremidade 3' da molécula de RNA, permitindo a formação de moléculas exclusivas de cDNA. Bastante utilizado para a avaliação de genes de sequência conhecida. Também permite a realização da RT-PCR em um único passo.

Kawasaki (1990), avaliando a eficiência dos diferentes iniciadores – oligo (dT), hexâmeros randômicos *antisense* – em relação à síntese de cDNA utilizando quantidades iguais de RNA viral obtidas de diferentes concentrações de células (50.000/5.000/500/50), mostrou que os iniciadores hexâmeros randômicos são os que apresentam melhores resultados de amplificação.

Otimização da Transcrição Reversa

Ocasionalmente, sequências de RNA-molde podem ser refratárias à amplificação devido à presença de estruturas secundárias intramoleculares. Neste sentido, diversas condições têm sido referidas na literatura capazes de melhorar o processamento da RT. Estes procedimentos incluem: desnaturação do molde de RNA a 65°C durante 5 min, pré-tratamento do RNA com hidróxido de metilmercúrio, adição de DMSO e realização da RT a altas temperaturas (55°C) na presença de um agente termoestabilizante como a trealose (Das et al., 2001).

Além disso, as reações de RT-PCR utilizadas para a análise de RNA podem coamplificar sequências de DNA presentes na amostra (contaminação). Para evitar tais complicações, o DNA pode ser excluído com o uso de DNase (isenta de RNase) ou utilizando éxons como alvo de amplificação. Utilizando RT com baixa ou nenhuma atividade RNase H, o cDNA formado pode ser tratado com RNase H, o que melhora a eficácia da reação de amplificação pela PCR. Para sequências curtas, tal tratamento pode ser dispensável. Segundo Fox e Nathan (1997), o tratamento do cDNA com RNase H não melhora necessariamente a obtenção do produto, mas pode melhorar o produto formado.

Variações da PCR e outros Sistemas de Amplificação

Outras aplicações específicas das reações em cadeia pela polimerase também têm sido desenvolvidas, como, por exemplo: PCR *multiplex*, PCR *in situ*, PCR semi e/ou quantitativa, PCR degenerada e invertida, reação de sequenciamento de PCR (mais detalhes ver Mullis, Ferré, Gibbs, 1994; Taylor, Logan, 1995; Eggeling; Vogel, 1995; então Lee; Morse; Olsvik, 1997; então). Outra variação da PCR atualmente muito empregada é a PCR em tempo real, mais detalhes sobre este tema ver Capítulo 10.

Da mesma forma, diferentes sistemas de amplificação estão atualmente disponíveis comercialmente: reação de amplificação pela ligase (LCR), amplificação Q β -replicase, amplificação baseada na sequência

de ácido nucleico (NASBA), sistema de amplificação baseado na transcrição (TMA) e sistema de replicação de sequência autossustentada (3SR) (Templeton, 1992; Lee; Morse; Olsvik, 1997).

Referências

- Abramson, R.D. Thermostable DNA polymerases. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J., eds. *PCR Strategies*. Academic Press, Inc. Oval Road, London, Cap. 4, 1995, pp. 39-57.
- Atlas, R.M.; Bej, A.K. Polymerase chain reaction. In: Gerhardt, P.; Murray, R.G.E.; Wood, W.A.; Krieg, N.R., eds. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology (AsM Press), Washington, D.C., Cap. 19, 1994, pp. 418-435.
- Brock, T.D.; Freeze, H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol.*, 98(1): 289-297, 1969.
- Chelly, J.; Kahn, A. RT-PCR and RNAm quantitation. In: *The Polymerase Chain Reaction* Mullis, K.B.; Ferré, F.; Gibbs, R.A., eds. T. Birkhäuser Boston, Cap. 8, 1994.
- Das, M.; Harvey, I.; Chu, L.L.; Sinha, M.; Pelletier, J. Full-length cDNAs: more than just reaching the ends. *J. Physiol. Genomics.*, 6:57-80, 2001.
- Davis, L.G.; Kuehl, W.M.; Battey J.F. In vitro amplification of DNA using the polymerase chain reaction (PCR) and the thermostable Taq DNA polymerase. In: *Basic Methods in Molecular Biology* Davis, L.G.; Kuehl, W.M.; Battey J.F., eds.. 2nd ed. Appleton & Lance, Norwalk, Connecticut. Section 4, 1994, pp. 114-124.
- Diaci, R. Practical considerations for the designs of quantitative PCR assays. In: *PCR Strategies* Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J., eds. . Academic Press, Inc. Oval Road, London, Cap. 7, 1995.
- Eggeling, F.Von.; Spielvogel, H. Applications of random PCR. *Cell. Mol. Biol.*, 41(5): 653-670, 1995.
- Ferrari, M.; Cremonesi, L.; Carrera, P.; Bonini, P.A. Molecular diagnosis of genetic diseases. *Clin. Biochem.*, 29 (3): 201-208, 1996.
- Fox, D.K.; Nathan, M. Optimizing RT-PCR: RNA and primer choices. *Focus*, 19(3): 48-50, 1997.
- Hayashi, K. Manipulation of DNA by PCR. In: Mullis, K.B.; Ferré, F.; Gibbs, R.A., eds. *The Polymerase Chain Reaction*. Birkhäuser Boston, Cap. 1, 1994.
- Innis, M.A.; Gelfand, D.H. Optimization of PCRs. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sminsky, J.J.; White, T.J., eds. Academic Press, San Diego, CA, Cap. 1, 1990.
- Kawasaki, E.S. Amplification of RNA. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. (Ed.). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, CA, Cap. 3, 1990.
- Kotewicz, M.L.; D'Alessio, J.M.; Driftmier, K.M.; Blodgett, K.P.; Gerard, G.F. Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*. *Gene*, 35(3):249-258, 1985.
- Kwok, S.; Chang, S.Y.; Sninsky, J.J.; Wang, A. A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers. *PCR Methods and Appl.*, 3(4): S39-S47, 1994.
- Lai-Goldman, M.; Lai, E.; Grody, W.W. Detection of human immunodeficiency virus (HIV) infection in formalin-fixed, paraffin embedded tissues by DNA amplification. *Nucleic Acids. Res.*, 16(16): 8191, 1988.
- Landre, P.A.; Gelfand, D.H.; Watson, R.M. The use of Cosolvents to enhance amplification by the polymerase chain reaction. . In: *PCR Strategies*. Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sminsky, J.J., eds. Academic Press, In. Oval Road, London, Cap. 1, 1995.
- Lee, C.C.; Wu, X.W.; Gibbs, R.A.; Cook, R.G.; Muzny, D.M.; Caskey, C.T. Generation of cDNA probes directed by amino acid sequence: cloning of urate oxidase. *Science*, 239(4845):1288-1291, 1988.
- Lee, H.H.; Morse, S.A.; Olsvik, O., eds.). Nucleic acid amplification technologies: application to disease diagnosis. BioTechnique® Books, Div. Eaton Publishing, St. Natick, Massachusetts-USA, 1997, p. 286.
- Linhard, C.; Shamir, R. The degenerate primer design problem. *Bioinformatics*, 18(Suppl. 1):S172- S180, 2002.
- McPherson, M.J.; Møller, S.G. Understanding PCR. In: McPherson, M.J.; Møller, S.G, eds. *PCR*. BIOS Scientific Publishers Ltd. Oxford, UK, Cap. 2, 2000.
- McPherson, M.J.; Møller, S.G. Reagents and instrumentation. In: McPherson, M.J.; Møller, S.G, eds. *PCR*. BIOS Scientific publishers Ltd. Oxford, UK, Cap. 3, 2000.
- Mitsubishi, M. Technical report: Part 2. Basic requirements for designing optimal PCR primers. *J. Clin. Lab. Anal.*, 10:285-293, 1996.
- Myers, T.W.; Sigua, C.L. Amplification of RNA: high-temperature reverse transcription and DNA amplification with *Thermus Thermophilus* DNA polymerase. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, eds. *PCR Strategies*. Academic Press, INC, Cap. 5, 1995.
- Mullis, K.B.; Ferré, F.; Gibbs, R.A., eds. *The Polymerase Chain Reaction*. Birkhäuser, Boston, USA. 1994, p. 458.
- Noonam, K.E.; Rominson, I.B. mRNA phenotyping by enzymatic amplification of randomly primed cDNA. *Nucleic Acids Res.*, 16 (21): 10366, 1988.

- Neumaier, M.; Braun, A.; Wagener, C. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. International Federation of Clinical Chemistry Scientific Division Committee on Molecular Biology Techniques. *Clin. Chem.*, 44(1): 12-26, 1998.
- Quin, F.D. Sample preparation for nucleic acid amplification. In: Lee, H.; Morse, S.; Olsvik, O., eds. *Nucleic Acid Amplification Technologies. Applications to Disease Diagnosis*. BioTechniques® Books, Div. Eaton Publishing (Softcover Edition) Birkhäuser Boston (Hardcover Edition), Cap. 4, 1997.
- Shibata, D. Preparation of nucleic acids for archival material. In: Mullis, K.B.; Ferré, F.; Gibbs, R.A., eds. *The Polymerase Chain Reaction*. Birkhäuser Boston, Cap. 4, 1994.
- Shimizu, H.; Burns, J.C. Extraction of nucleic acids: sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J., eds. *PCR Strategies*. Academic Press, INC, Cap. 3, 1995.
- Saiki, R.K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K.B. Enzymatic Amplification of β -globin genomic sequences and Restriction site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science*, 230: 1350-1354, 1985.
- Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B.; Erlich, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 (4839): 487-491, 1988.
- Salazar, L.A.; Hirata, M.H.; Cavalli, S.A.; Machado, M.O.; Hirata, R.D. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clin. Chem.* 44 (8 Pt1): 1748-1750, 1998.
- Seibel, L.F.B.; Lemos, M.; Lifschitz, S. Bancos de Dados de Genoma. Disponível em <http://139.82.111.85/lf/hp/Tutorial%20SBBD2000%20FinalRev.pdf>, acessado em 16 de outubro de 2007.
- Veres, G.; Gibbs, R.A.; Scherer, S.E.; Caskey, C.T. The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. *Science*, 237(4813): 415-417, 1987.
- Taylor, G.R.; Logan, W.P. The polymerase chain reaction: new variations on an old theme. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 6(1): 24-29, 1995.
- Templeton, N.S. The polymerase chain reaction: history, methods, and applications. *Diagn. Mol. Pathol.*, 1(1): 58-72, 1992.
- Vosberg, H.P. The polymerase chain reaction: an improved method for the analysis of nucleic acids. *Hum. Genet.*, 83(1): 1-15, 1989.
- White, T. J.; Madej, R.; Persing, D.H. The polymerase chain reaction: clinical applications. *Adv. in Clin. Chem.*, 29: p:161-196, 1992.
- Williams, S.D.; Kwok, S. Polymerase chain reaction: applications for viral detection. In: *Laboratory Diagnosis of Infections*. Lennette, E.H., eds. Dekker, New York, 1991, p. 147-173.

10. Sistema de Amplificação de Ácidos Nucleicos por PCR em Tempo Real

Sonia Quateli Doi
Enrico Fuini Puggina
Ana Maria de Lauro Castrucci

Introdução

Vários métodos foram descritos para a análise de quantificação de ácidos nucleicos (DNA e RNA). Entre estas técnicas, a reação de polimerização em cadeia pela polimerase (PCR), que pode ser associada à transcrição reversa (RT), mostrou-se uma poderosa ferramenta que permite a análise de quantidades mínimas de ácidos nucleicos (ver Capítulo 9). Contudo, este método baseia-se na quantificação dos produtos finais da reação de amplificação da sequência-alvo. Desenvolveram-se então sistemas quantitativos de PCR e RT-PCR que refletissem a quantidade inicial da sequência-alvo a partir da coamplificação competitiva de um controle ou padrão interno. A utilização deste método requer que a molécula-alvo e o padrão competitivo sejam amplificados com igual eficiência e atinjam o platô de amplificação simultaneamente. Deste modo, a quantificação relativa pode ser estabelecida facilmente desde que se leve em conta os cuidados acima recomendados para coamplificação do padrão. A quantificação absoluta já requer a determinação acurada da concentração do controle interno para uma curva-padrão. A análise quantitativa da sequência-alvo e do controle interno geralmente é feita em gel de agarose ou acrilamida pela medida da intensidade de brometo de etídio contido nos produtos de PCR. Embora estes métodos sejam úteis, requerem maior ou menor manipulação pós-PCR, que, além de tornar a análise mais longa, podem introduzir variáveis de difícil controle e levar ao risco de contaminação do laboratório com os produtos de PCR.

Mais recentemente, um método de PCR quantitativa em tempo real foi desenvolvido por Holland et al. (1991), no qual um sinal fluorescente é emitido proporcionalmente ao acúmulo do produto de PCR durante a reação. Contrário ao método de medida dos produtos finais, a monitorização da reação do início ao fim permite que a quantificação seja efetuada em tempos

precoces, em que a reação é linear. A medida de fluorescência em cada amostra produz um sinal homogêneo, que é especificamente associado com a molécula-alvo amplificada e relacionado à quantidade dos produtos de PCR formados.

O método de PCR em tempo real tem várias vantagens sobre outros métodos de medidas de expressão gênica, por exemplo:

1. Não requer manipulações pós-PCR adicionais para análise do resultado.
2. É um método de alta sensibilidade, capaz de amplificar quantidades muito reduzidas de DNA. Pode ser de 10 a 100 mil vezes mais sensível que o ensaio de proteção de RNase, e cerca de mil vezes mais sensível que a hibridação por *dot-blot*.
3. Tem menor coeficiente de variação (~ 14%) do que os métodos de análise usando medidas de densitometria de banda ou de hibridação de sonda (~ 45%).

As desvantagens mais importantes deste método incluem:

1. Alto custo do equipamento e dos reagentes.
2. Devido à alta sensibilidade de detecção e amplificação de DNA, é necessário extremo cuidado para evitar contaminação da amostra, assim como amplo conhecimento da tecnologia para que os resultados sejam confiáveis e precisos.

Tecnologia de PCR em Tempo Real

A amplificação da sequência-alvo por PCR em tempo real pode ser dividida em quatro fases principais: a linear de base, exponencial precoce, exponencial ou *log-linear* e platô.

Durante os primeiros 10 a 15 ciclos, a emissão total de fluorescência em cada ciclo ainda é baixa e não ul-

trapassa a linha de base. Na fase exponencial precoce, a quantidade de fluorescência emitida atinge um valor significativamente maior (geralmente 10 vezes o desvio padrão da linha de base) do que os valores de *background*. Dizemos então que este valor cruzou a linha limiar (*threshold*) e o ciclo em que ocorre é denominado de C_t (*threshold cycle*) ou CP (*crossing point*). Este valor representa o número inicial de cópias do gene estudado na amostra.

Na fase *log-linear* ou exponencial, em condições ideais de reação, a quantidade do produto de PCR dobra a cada ciclo. Esta fase termina quando os componentes da reação se tornam limitados. Então, a intensidade de fluorescência atinge um platô e não pode mais ser usada para cálculo de amplificação do DNA.

A amplificação da sequência-alvo por PCR em tempo real pode ser realizada utilizando-se diversos tipos de marcadores fluorescentes, como, por exemplo:

- a) Sonda fluorescente TaqMan®. Requer *Taq* polimerase com atividade 5' exonuclease.
- b) Sinalizador (*beacon*) molecular fluorescente.
- c) Iniciador ligado à sonda fluorescente em forma de grampo (Scorpion®).
- d) Sondas MGB®s (*minor groove binders*)
- e) Iniciadores e sonda não marcados, com detecção da sequência amplificada por meio de reagente fluorescente (SYBRGreen®) que se liga à fita dupla de DNA sintetizada.

Os quatro primeiros métodos utilizam marcadores fluorescentes que são sequência-específicos. Quando os espectros de emissão de fluorescência são devidamente combinados, pode-se identificar mais de uma sequência-alvo ao mesmo tempo e em um mesmo tubo, permitindo assim a realização de reações denominadas múltiplas ou *multiplex*. Ao contrário, o reagente SYBRGreen® liga-se inespecificamente a qualquer fita dupla de DNA. Estas técnicas serão discutidas individualmente a seguir.

A reação é realizada em termociclador com sistema de detecção espectrofluorimétrica associada a um computador para registro e coleção de dados com *software* de análise. Os equipamentos utilizam um sistema de raio *laser* (por exemplo, ABI Prism Sequence Detector System 7700 ou 9700, ABI Biosystems) ou sistema óptico, com lâmpada halogênio/tungstênio associada a filtros de luz (por exemplo, ABI Prism Sequence Detector System 7300 ou 7500, iCycler, Bio-Rad; Lightcycler, Roche). Nos sistemas utilizando o raio *laser*

acima mencionados, só é possível a análise simultânea de dois marcadores fluorescentes, enquanto o sistema óptico com filtros permite a detecção de até quatro marcadores diferentes.

A reação de RT pode ser combinada com a de PCR (RT-PCR) utilizando-se uma única enzima que realize a transcrição reversa do RNA e posteriormente a amplificação do cDNA da molécula-alvo em um mesmo tubo e em um só evento. Alternativamente, pode-se realizar a transcrição reversa do RNA em reação à parte, e posteriormente utilizar o cDNA para uma ou mais reações de amplificação por PCR. Há várias vantagens e desvantagens em cada método. No método de RT-PCR combinado em uma só reação, o objetivo é reduzir as variações do ensaio, desde que ambas as reações enzimáticas são realizadas em um mesmo tubo. Uma desvantagem desta metodologia é a utilização do RNA como ponto de partida, pois estas moléculas estão sujeitas à degradação progressiva quando submetidas a múltiplos eventos de congelamento/descongelamento ou à manipulação inadequada. Portanto, em casos nos quais a mesma amostra deva ser utilizada em diferentes ocasiões, há duas possibilidades: utilizar o método de RT e PCR em reações separadas, ou guardar as amostras de RNA (a -80°C) em alíquotas apropriadas para o número desejado de reações.

Técnica Utilizando Sondas de Hibridação TaqMan®

O desenvolvimento da dinâmica química da técnica do TaqMan® baseia-se na amplificação de uma sequência-alvo utilizando um par de iniciadores, uma sonda de hibridação não extensível e *Taq* polimerase com atividade 5'-exonuclease que cliva a sonda hibridada à sequência-alvo durante a fase de extensão da PCR. A sonda de hibridação contém dois marcadores de diferentes espectros de fluorescência: um na extremidade 5' que serve como repórter e outro localizado na extremidade 3' que funciona como inibidor (*quencher*) do primeiro. Quando a sonda está intacta, a emissão de fluorescência é inibida pela própria proximidade física entre o repórter e seu inibidor. Durante a fase de extensão dos ciclos de PCR, a degradação da sonda de hibridação pela exonuclease libera os marcadores fluorescentes e o sinal luminoso do repórter pode então ser detectado (Fig. 10.1). Para determinar a linha de base, são excluídas as flutuações de fluorescência não originadas pela amplificação específica da PCR, medidas por meio do uso do carboxi-X-rodamina (ROX), marcador passivo de fluorescência que

vem incluído na mistura de reagentes utilizados neste ensaio. O espectro de fluorescência de todos os 96 poços é medido simultânea e continuamente durante os ciclos da PCR, no termociclador, geralmente ao final

de cada fase de extensão. Assim, o incremento relativo resultante da emissão do sinal fluorescente é monitorizado em tempo real durante a amplificação da sequência-alvo. No quadro 10.1, estão alguns exemplos de indicadores fluorescentes mais utilizados nas sondas TaqMan®.

O detector de fluorescência combinado com o termociclador e sistemas de *software* automatizam a detecção do sinal luminoso do marcador da extremidade 5' da sonda produzindo a quantificação de ácidos nucleicos formados proporcionalmente à quantidade inicial da molécula-alvo. No equipamento ABI Prism 7700 Sequence Detector, por exemplo, um algoritmo computadorizado compara o total de fluorescência emitido pelo repórter (R) com a emissão do inibidor ou *quencher* (Q) a cada 8,5 segundos durante a PCR, gerando valores ΔR_n (R/Q), também chamados ΔRQ . Os valores de ΔR_n refletem o total de sonda hibridada que está sendo degradada e são calculados de acordo com a seguinte equação: $\Delta R_n = (R_n^+) - (R_n^-)$, onde R_n^+ = intensidade de emissão do repórter/intensidade de emissão do inibidor em um dado ponto (tempo) em um determinado tubo de reação, e R_n^- = intensidade de emissão do repórter/intensidade de emissão do inibidor medida anteriormente à amplificação por PCR no mesmo tubo de reação. A intensidade de fluorescência do inibidor TAMRA praticamente não se altera durante a PCR, servindo, portanto, para normali-

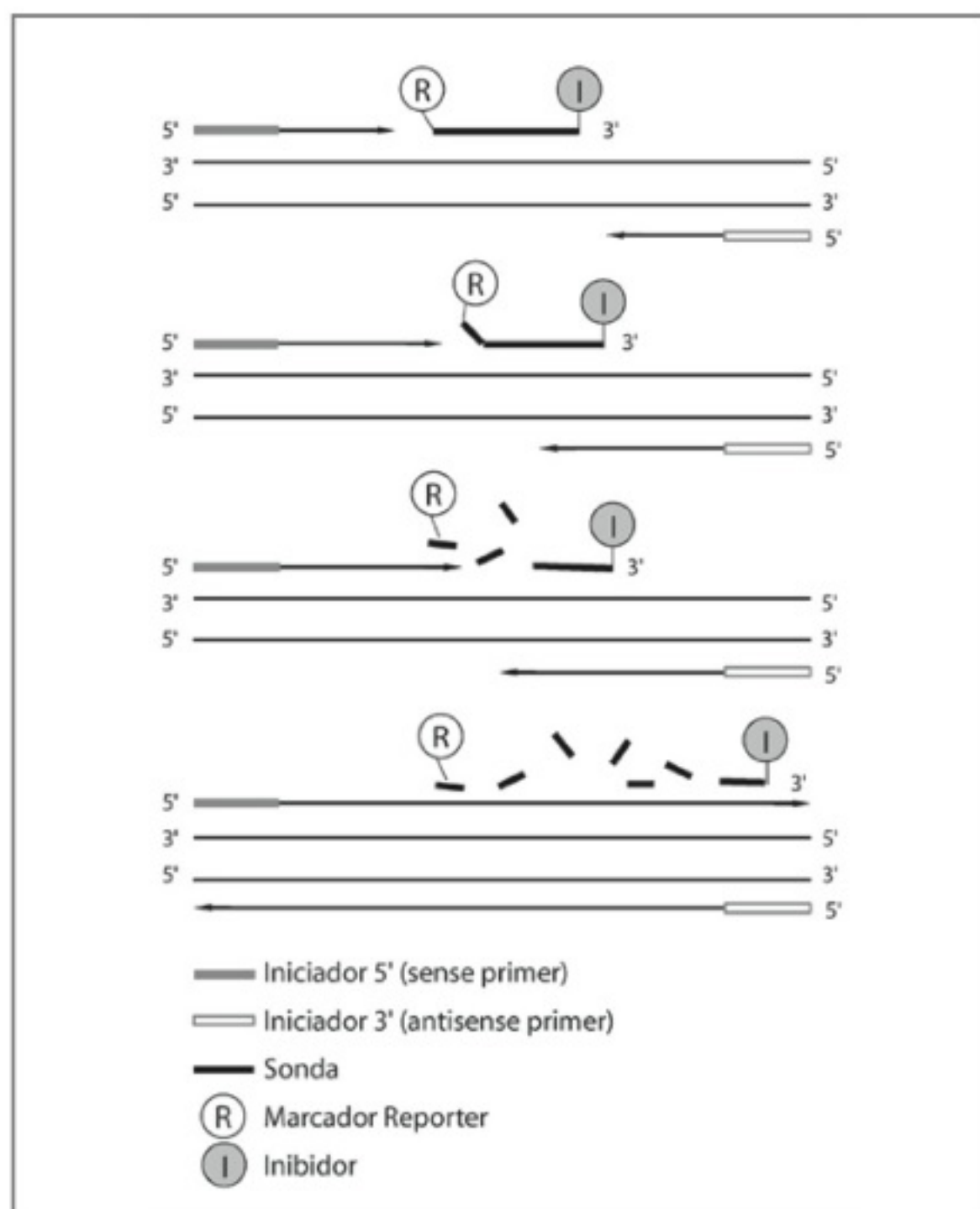


Figura 10.1 – Representação esquemática da dinâmica de amplificação do DNA por meio da PCR em tempo real.

Quadro 10.1 – Exemplos de indicadores fluorescentes usados nas sondas TaqMan®.

Repórter na extremidade 5' da sonda	
FAM	6-carboxifluoresceína
Texas Red	cloreto ácido de sulfo-rodamina
Cy5	penta N-hidroxisuccinimide metina
HEX	hexaclorofluoresceína
VIC	Very Important Control (patenteado pela ABI Biosystems)
Inibidor (<i>quencher</i>) na extremidade 3' da sonda	
TAMRA	6-carboxi-tetrametil-rodamina
Blak Hole (BHQ)	

zação das variações do marcador repórter. Durante os primeiros ciclos de amplificação da PCR, os valores de ΔRn permanecem baixos. Quando uma quantidade suficiente de sonda de hibridação foi clivada, a intensidade de emissão fluorescente do repórter aumenta. A maioria das amplificações de PCR alcançam uma fase platô de emissão fluorescente do repórter se a reação for realizada até um alto número de ciclos.

O limiar relativo de emissão de fluorescência é estabelecido em função de uma linha de base média do ΔRn durante os primeiros 10-15 ciclos. O algoritmo calcula o ciclo em que cada amplificação alcança um nível significativo (C_t), ou seja, o ponto em que a fluorescência acima da linha limiar é primeiro detectada (em geral, 10 vezes o desvio-padrão). O valor de C_t calculado é proporcional ao número de cópias da molécula-alvo presente na amostra (Fig. 10.2). O uso de uma câmera com dispositivo associado de carga (CCD) permite a detecção de um amplo espectro de comprimentos de onda emitidos.

Técnica Utilizando Sinalizadores Moleculares

Os sinalizadores (*beacons*) moleculares são oligonucleotídeos de fita única que funcionam como sondas de detecção de amplificação de DNA por PCR. Estes sinalizadores formam uma estrutura de haste e alça ou grampo (Fig. 10.3).

A parte que forma a alça contém uma sequência complementar à sequência-alvo, e a haste é formada pelo pareamento de sequências complementares entre si localizadas nas extremidades da sonda. Um marcador fluorescente é ligado covalentemente a uma das extremidades (5') e um cromóforo não fluorescente que funciona como inibidor de fluorescência é ligado à extremidade oposta (3'). Este inibidor de fluorescência, quando próximo ao marcador fluorescente dissipa a energia recebida do fluorescente em forma de calor. Portanto, quando livres em solução, na forma haste-alça os sinalizadores moleculares não fluorescem, mas, quando

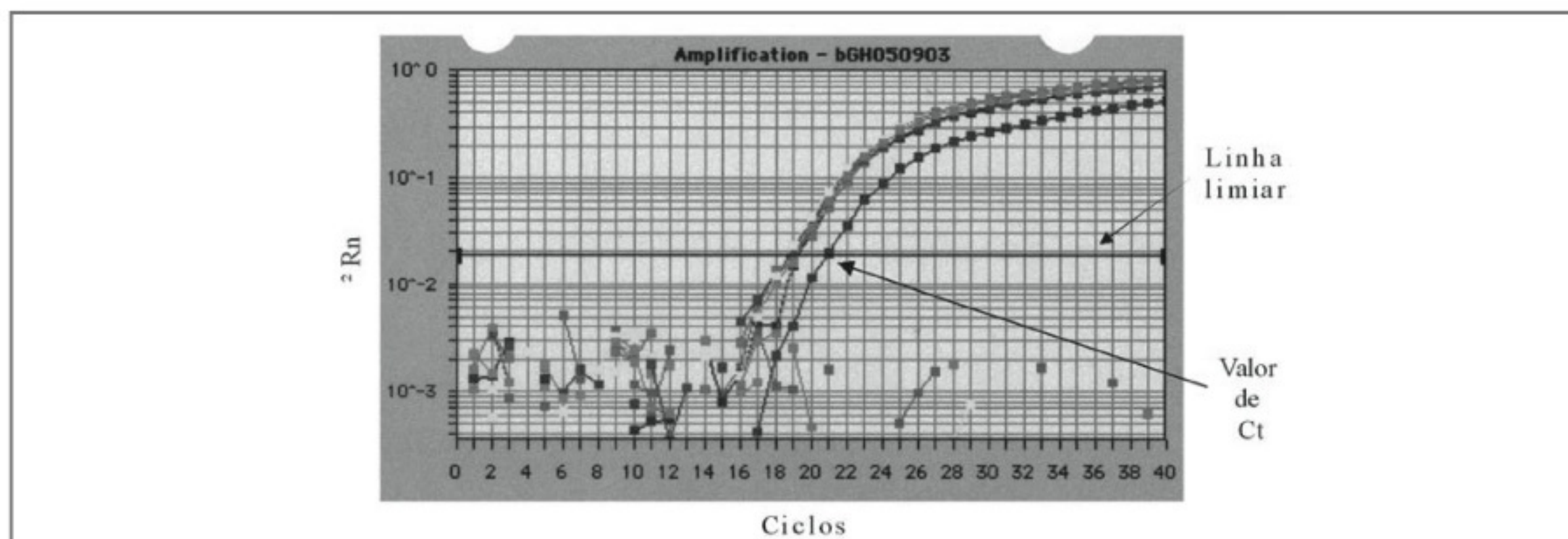


Figura 10.2 – Exemplo de gráfico plotado automaticamente pelo *software* SDS (ABI Biosystems), utilizando sonda marcada com repórter FAM e inibidor TAMRA. O ΔRn (ordenada) é calculado para cada ciclo (absissa) e a linha limiar é demarcada acima das flutuações do controle negativo (amostra sem DNA). O valor de C_t é dado pelo ponto de cruzamento do traçado de cada amostra com a linha limiar.

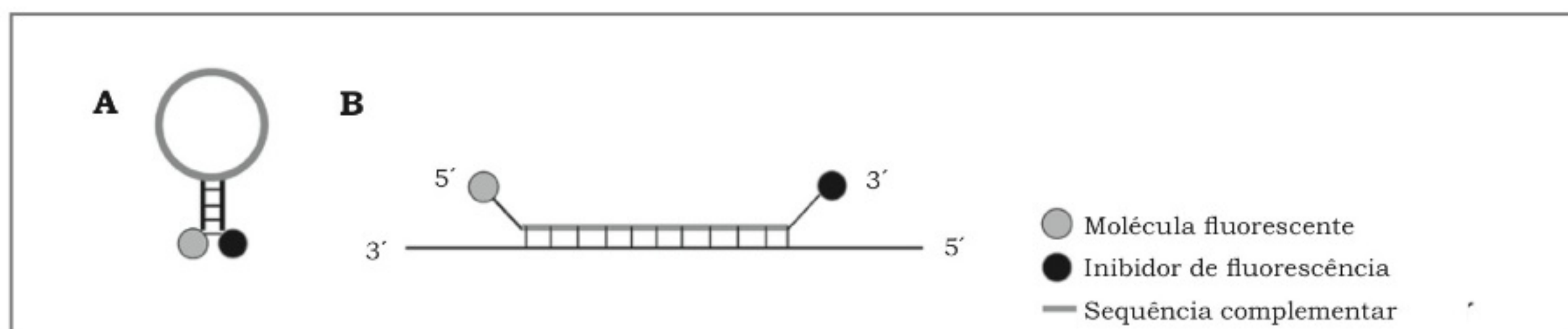


Figura 10.3 – (A) Sinalizador molecular (*beacon*) na forma livre, (B) Sinalizador molecular na forma híbrida à sequência-alvo.

hibridam com a sequência-alvo, sofrem uma alteração de conformação, distanciando o inibidor do marcador que permite a emissão de fluorescência do marcador. A forma híbrida do sinalizador com a sequência-alvo é mais estável que a forma livre haste-alça. Semelhante à técnica TaqMan®, o sinal luminoso é registrado no final de cada fase de extensão, quando o sinalizador que está hibridado à sequência-alvo emite fluorescência e o não hibridado retorna a sua posição haste-alça (não fluorescente). Estes sinalizadores moleculares podem ser marcados com vários pares de moléculas fluorescentes e inibidores (Quadro 10.2).

Técnica *Scorpion*

A técnica *Scorpion*, descrita por Whitcombe et al., (1999) caracteriza-se pela utilização de uma estrutura mista composta de uma sonda com marcador fluorescente ligada a um dos iniciadores, facilitando a hibridação intramolecular, que é termodinamicamente mais favorável do que a hibridação bimolecular sonda-sequência-alvo (Fig. 10.4). A sonda é colocada na forma de alça ou grampo na extremidade 5' do iniciador. A extremidade 5' da sonda é marcada com uma molécula fluorescente, e a extremidade 3', com um inibidor de fluorescência.

Quadro 10.2 – Exemplos de marcadores fluorescentes que podem ser utilizados com os sinalizadores moleculares.

Marcadores fluorescentes colocados na extremidade 5' do sinalizador	
FAM	6-carboxifluoresceína
TET	Tetracloro-6-carboxifluoresceína
TMR	Tetrametilrodamina
RHD	5-carboxirrodamina
Inibidores de fluorescência colocados na extremidade 3' do sinalizador	
DABCYL	Ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo) benzoico
DABSYL	Radical 4-dimetilaminoazobenzeno-4'-sulfonil

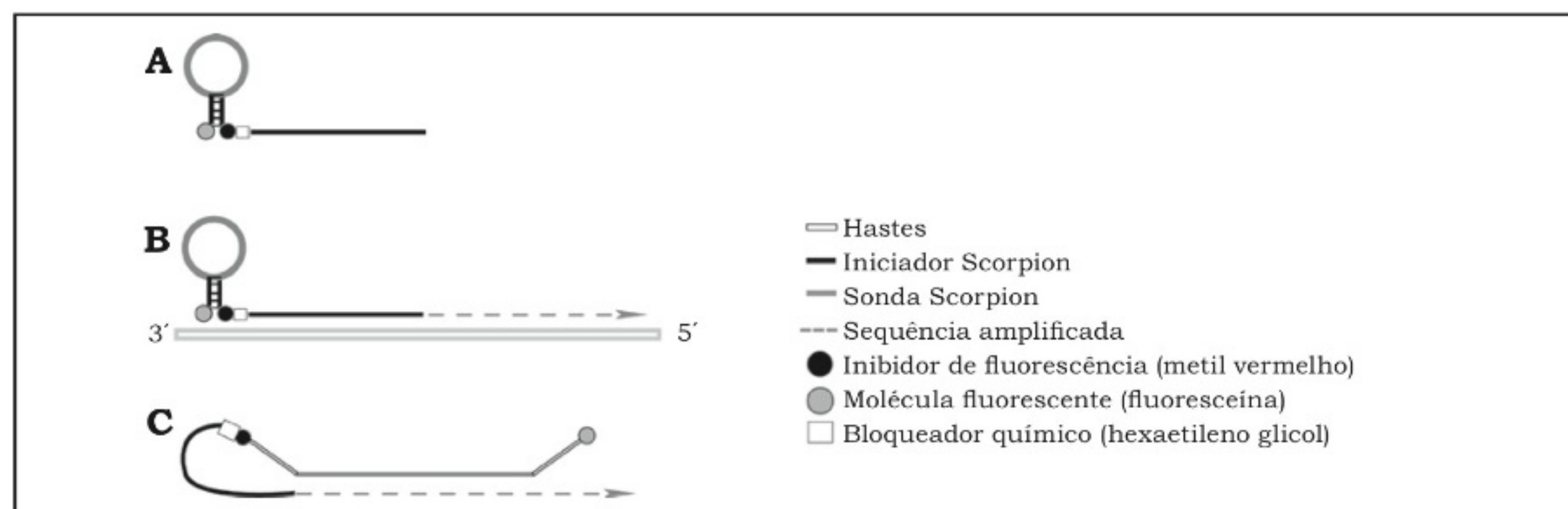


Figura 10.4 – Representação esquemática da sonda-indicador *Scorpion*. (A) Forma livre, não fluorescente. (B) Pareamento à sequência-alvo e início da extensão a partir do indicador. (C) Forma hibridada, fluorescente.

Na forma livre, não hibridada, a formação de uma haste de dupla fita resultante de uma pequena sequência complementar aproxima o marcador fluorescente e o inibidor, bloqueando assim a emissão do sinal fluorescente. A sequência da sonda é complementar a uma região interna da sequência-alvo amplificada pelo iniciador adjacente. Entre a extremidade 5' do iniciador e 3' da sonda há um monômero não amplificável (geralmente o hexa-etileno glicol), que impede a cópia da haste e da sonda durante a fase de polimerização da PCR. À medida que a hibridação ocorre, a formação de grampo é desestabilizada, distanciando o marcador fluorescente do inibidor e permitindo a emissão do sinal fluorescente. Desta forma, a fluorescência gerada é proporcional ao número de ampliações da molécula-alvo. A hibridação unimolecular é cineticamente favorável pelo fato de não ser dependente da probabilidade de encontro entre a sonda, presente em relativamente baixa concentração, e o fragmento amplificado. Esta técnica permite a introdução de condições para ciclos mais rápidos e produz um sinal significativamente mais potente, comparado com TaqMan® e sinalizador molecular. Outra vantagem sobre a técnica do TaqMan® é que a reação pode ser realizada à temperatura ótima para a polimerase, em vez de usar temperatura reduzida necessária para o deslocamento e degradação da sonda, como nos ensaios para a atividade 5'-exonuclease.

Os iniciadores *Scorpion* são geralmente localizados próximos um ao outro, de tal forma que o segmento amplificado é bastante curto (em geral de 100 a 200 pares de bases).

Nas sondas *Scorpion* originais, pode ocorrer um certo bloqueio de fluorescência até mesmo na forma aberta da sonda, pelo fato de o inibidor estar localizado muito

próximo ao marcador fluorescente. Portanto, uma modificação da estrutura formando *dúplex Scorpions* foi desenvolvida mais recentemente, em que o marcador fluorescente e o inibidor são colocados em diferentes oligonucleotídeos (Fig. 10.5). O iniciador específico, o monômero bloqueador de amplificação, a sonda e o marcador fluorescente formam um oligonucleotídeo, enquanto o inibidor é ligado à extremidade 3' do oligonucleotídeo, que é inteiramente complementar à sequência da sonda. Como esse arranjo conserva o mecanismo de hibridação intramolecular, é mais favorável que a reação de reanelamento entre o oligonucleotídeo contendo o inibidor e a sonda *Scorpion*, resulte em um sinal de maior intensidade que a estrutura *Scorpion* original. Uma vantagem adicional do *Scorpion* modificado é que este é mais fácil de estruturar e sintetizar, por não ter a formação em alça. Na construção da sonda *Scorpion*, é fundamental que se evite a formação de estruturas secundárias que possam competir com a hibridação da estrutura primária.

Uso de Sondas MGB®

As sondas denominadas MGB® são sintetizadas contendo uma molécula que tem uma estrutura espacial curva e que se encaixa no sulco menor da fita dupla de DNA. Quando os compostos MGB® (por exemplo, tripeptídeo dihidrociclopirroloindola) são conjugados a uma das extremidades de nucleotídeos curtos, formam uma sonda que hibridiza de forma muito estável com a fita de DNA complementar. Embora o composto MGB® possa ser colocado em qualquer das extremidades da sonda, é geralmente ligado à extremidade 3' por ser mais fácil de sintetizar. Estas sondas são então ligadas a dois marcadores fluorescentes, um repórter e

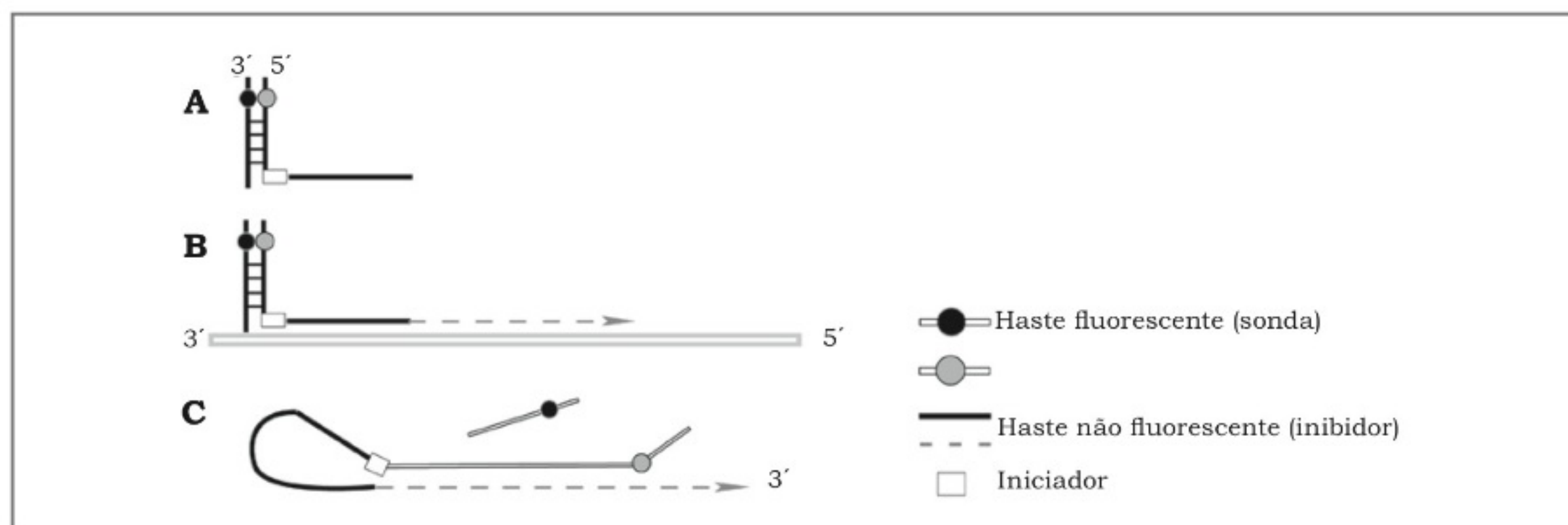


Figura 10.5: Representação esquemática da sonda *Scorpion* modificada (sem formação em alça). A haste adjacente iniciador é complementar a uma parte da sequência amplificada. **(A)** Forma livre (sonda não fluorescente). **(B)** Pareamento do iniciador com a sequência-alvo e amplificação da fita de DNA. **(C)** Sonda hibridada (fluorescente).

um inibidor e são utilizadas em ensaios contendo *Taq* polimerase com atividade 5'-exonuclease, como as sondas TaqMan®. A vantagem desta tecnologia é que a temperatura de desnaturação, relativamente alta, permite o uso de sondas significativamente mais curtas e mais específicas, especialmente úteis para a discriminação de sítios polimórficos de um só nucleotídeo (SNP). É também eficiente em regiões do genoma ricas em nucleotídeos A/T. Um problema associado a esta técnica é a restrição quanto a locais de ligação deste tipo de sonda, como, por exemplo, em junções de *splicing*. Isto dificulta a seleção de sondas, problema que pode ser em parte compensado pela vantagem do uso de sonda curtas.

Técnica de Marcação com SYBRGreen®

Pelo fato do marcador SYBRGreen® associar-se inespecificamente à dupla fita de DNA, torna-se imprescindível a verificação da especificidade da amplificação do DNA, através de uma análise das variações de fluorescência em função da temperatura de desnaturação (T_m). Esta análise, denominada Análise da Curva de Dissociação, é uma opção dentro do *software* da PCR em tempo real programada para correr imediatamente após o término dos ciclos da PCR. A temperatura sobe gradativamente e, à medida que atinge a temperatura de desnaturação do produto da PCR (dupla fita de DNA fluorescente), as fitas se separam e a fluorescência cai. Assim, se houver mais de um produto formado, encontraremos quedas de fluorescência em mais de uma temperatura. Ao contrário, encontraremos um pico único equivalente à derivada da queda de fluorescência na temperatura de dissociação do produto da PCR. A análise é feita para cada poço individualmente e a derivada da queda de fluorescência é registrada nas temperaturas entre 60 e 95°C.

Ainda em função da falta de especificidade da marcação com SYBRGreen®, não é possível neste método a realização de reações *multiplex*, ou seja, amplificação de mais de uma sequência-alvo num mesmo tubo, utilizando separação através de cor. Entretanto, este reagente é muito utilizado e pode ser conveniente quando se pretende analisar apenas um ou dois genes por ser menos dispendioso que as sondas fluorescentes.

Seleção de Iniciadores e Sondas

Muitos programas de computador que auxiliam na construção de oligonucleotídeos iniciadores e sondas são disponíveis em rede. Listamos abaixo alguns dos mais

úteis. A página (<http://www.operon.com/default.aspx>) fornece recurso para selecionar iniciadores e para o cálculo da temperatura de desnaturação (T_m). Um aspecto adicional interessante é que o programa também mostra o complemento para o oligonucleotídeo, traça a sequência contra ela mesma e pode comparar esta sequência contra um outro oligonucleotídeo. O programa Primer3 é oferecido na página (<http://biotools.umassmed.edu/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) e pode ser utilizado para selecionar sequências de iniciadores ou de sondas. Entretanto, não aborda o problema de estruturas secundárias que são relevantes na concepção dos iniciadores e sondas para PCR em tempo real, especialmente em se tratando de sinalizadores (*beacons*) moleculares e Scorpions®. O JaMBW Primer Design web site (<http://www.bioinformatics.org/JaMBW//Toc.html>) é muito útil para seleção de iniciadores, mas não para sondas; contudo parte da sua funcionalidade é limitada à ferramenta de busca do Netscape. Há ainda programas comerciais para ajudar com a seleção e construção específica para iniciadores e sondas, como o Primer Express da ABI Biosystems. Alguns fabricantes de oligonucleotídeos, como a Integrated DNA Technologies também oferecem programas gratuitos (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>) bastante adequados para a construção de sondas e iniciadores de qualidade.

É recomendável que após a seleção dos iniciadores e sondas apropriados para o ensaio, as sequências selecionadas sejam testadas quanto a sua especificidade, isto é, se pareiam única e exclusivamente com a sequência-alvo. Deve-se ressaltar ainda a importância de desenhar iniciadores e sondas que, sempre que possível, atravessem regiões de íntrons para prevenir eventuais contaminações com DNA. Para estas tarefas pode-se utilizar uma ferramenta de procura de alinhamento local básica (BLAST), na página (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (*National Center for Biotechnology Information, NCBI*).

É ainda muito importante considerar o espectro de fluorescência de cada marcador ao colocar dois marcadores fluorescentes (repórter e inibidor) numa mesma sonda, ou ao selecionar marcadores para reações usando mais de uma sonda no mesmo tubo (*multiplex*). A condição ideal é que a sobreposição dos espectros de fluorescência seja a mínima possível. Os fluoróforos ideais para *multiplex* de até 4 genes são FAM, HEX, Texas Red e Cy5.

Inibidores de Fluorescência

Inibidores (*quencher*s) recebem a energia proveniente de um repórter fluorescente e a dissipam por meio

de um destes dois mecanismos: a) dissipação de energia fluorescente em forma de calor, como ocorre com o sinalizador molecular e a estrutura *Scorpion*; b) transferência de energia ressonante de fluorescência (FRET), em que o repórter fluorescente (doador) transfere sua energia ao inibidor (aceptor), que libera a energia em forma de luz de alto comprimento de onda, como acontece com as sondas que sofrem hidrólise. Neste último caso, o marcador fluorescente e o inibidor podem estar separados por uma distância de até 40 pares de bases. Portanto, em função de o FRET ser dependente de distância, é conveniente que a sonda com dupla marcação seja a mais curta possível. Até recentemente, inibidores como DABCYL e TAMRA, tinham inúmeros inconvenientes, como sobreposição de espectro entre o fluorescente e a molécula inibidora (DABCYL) ou fluorescência inerente do inibidor (TAMRA), resultando em uma proporção relativa de sinal/ruído ruim. Uma nova classe de inibidores sem fluorescência nativa está agora sendo usada, como os *Black Hole Quenchers (BHQ)*, sintetizados originalmente pela Biosearch Technologies, Novato, CA, USA (www.biosearchtech.com/bhq). Diferente do DABCYL, que tem uma absorção máxima a 474 nm, os BHQ podem inibir fluorescência dentro de todo o espectro de luz visível e dentro da faixa de luz infravermelha. Assim, os BHQs inibem mais eficientemente os tipos de fluorescentes mais comumente utilizados, como o FAM (absorção máxima 518 nm), TET (538 nm) e Cy5 (667 nm).

Outra vantagem teórica, em função de os BHQ não serem fluorescentes, é a possibilidade de selecionar múltiplos pares de corantes fluorescentes/inibidores e quantificar inúmeras reações de amplificação em um mesmo tubo.

Preparo da Amostra para o Ensaio de PCR em Tempo Real

Tipos de Amostras

Vários tipos de amostras podem ser utilizados para a extração de RNA ou DNA, como fragmentos cirúrgicos ou biópsias de órgãos ou tecidos, células em cultura, fluidos (por exemplo, sangue, urina, saliva, suco gástrico), tecido embocado em parafina etc. A extração de RNA de biópsia de tecido acaba levando ao problema de diluição da expressão dos genes, devido aos diferentes tipos celulares em um mesmo tecido acrescido da pequena quantidade de material disponível neste tipo de amostra. A introdução do método de captura por microdissecção a *laser* permite o isolamento de uma sub-

população pura de células em meio ao tecido. Por outro lado, esta técnica resulta em obtenção de quantidades ínfimas de tecido que, após a extração de RNA, pode reduzir drasticamente a quantidade de RNA obtido, comprometendo os processos posteriores. Recomenda-se, nestes casos, adicionar 20 ng de RNA carreador não poliadenilado imediatamente após a lise das células. A captura por laser é melhor utilizada em tecido fixado em formalina e embocado em parafina. Entretanto, extensiva degradação de RNA pode ocorrer antes ou durante o processo de fixação com formalina. Portanto, não só a escolha do fixador mas também a metodologia usada devem ser atentamente observadas para que se obtenha dados reprodutíveis. A técnica de RT-PCR em tempo real tem a vantagem de produzir *amplicons* tão pequenos quanto 60 pares de base e, dessa forma, torna-se bastante conveniente quando se usam amostras que sofreram degradação parcial.

Extração de RNA

A determinação precisa da concentração de RNA total é particularmente importante para a quantificação absoluta dos níveis de mRNA. Qualquer contaminação significativa com DNA resulta em medidas imprecisas. Vários métodos de extração de RNA têm sido utilizados, mas é recomendável que se obtenha RNA com alto índice de pureza, ou seja razão OD_{260}/OD_{280} igual ou maior que 1,9 e sem contaminação por DNA. Os métodos de extração de RNA que utilizam coluna de resina com grande afinidade para nucleotídeos, principalmente RNA, associada a um tratamento da amostra com DNase livre de atividade RNase têm se mostrado bastante úteis. Contudo, muitos pesquisadores receiam que a DNase esteja contaminada com RNase e afete o conteúdo total de RNA. Estudos da interferência do tratamento com DNase utilizando colunas RNeasy da Qiagen demonstraram que sem o tratamento com DNase havia uma significativa contaminação de DNA na amostra e a quantidade de RNA puro ficava entre 50 e 80%. Portanto, o tratamento com DNase-purificada (sem RNase) é altamente aconselhável nos métodos de extração de RNA. Um produto também largamente utilizado é o *turbo*-DNase (Ambion).

Amplificação de um Único Gene *versus* Múltiplos Genes em uma mesma Reação

Utilizando-se diferentes tipos de marcadores fluorescentes compatíveis entre si torna-se possível quanti-

ficar múltiplos genes simultaneamente numa única reação (num mesmo tubo). Esta técnica permite também a amplificação do gene-alvo juntamente com um controle interno (por exemplo β -actina, GAPDH, 18S RNA). Porém, na prática esta metodologia é limitada, pelo menos em parte, pela eventual sobreposição de espectro dos marcadores fluorescentes. É portanto aconselhável utilizar marcadores com mínima sobreposição do espectro de fluorescência em reações múltiplas (*multiplex*) num mesmo tubo, como aqueles mencionados no Quadro 10.1.

Para se evitar a interferência dos marcadores fluorescentes um sobre o outro, pode-se proceder à amplificação da molécula-alvo e do padrão interno em tubos diferentes durante o mesmo ensaio, mas o custo é proporcional a esse aumento no número de reações.

Reações *multiplex* apresentam vantagens importantes como a redução do volume necessário de amostra, a economia de tempo na montagem das reações e a grande redução de custo em reagentes. No entanto, deve-se estar atento a um importante fator limitante: as concentrações de Taq polimerase, dNTPs e $MgCl_2$ devem ser aumentadas proporcionalmente ao número de genes que se quer amplificar em um mesmo poço. A otimização dessas condições é crucial para o sucesso de reações com múltiplos genes. Em condições otimizadas, o desempenho da amplificação de um determinado gene em uma reação *multiplex* deve ser muito semelhante (diferença máxima de 0,5 Ct) ao seu desempenho quando amplificado sozinho. Otimizando-se as concentrações de reagentes, torna-se também possível utilizar sem preocupações rRNA 18S como padrão interno. Já, se as condições são subótimas, como a concentração de RNA ribossômico é muito mais alta que genes em estudo, torna-se um normalizador ineficiente que levará a resultados falsos.

Análise Quantitativa Relativa e Absoluta

Quantidade Relativa

Amplificando-se a molécula-alvo e o padrão interno, seja em um mesmo tubo ou em tubos separados, pode-se calcular a quantidade relativa da molécula-alvo em relação ao padrão interno (β -actina, GAPDH, rRNA etc).

No método de quantificação relativa, é importante levar-se em consideração a **eficiência de amplificação** da reação. Alguns cálculos de expressão gênica relativa assumem uma eficiência de amplificação ideal, ou seja, igual a 1, onde a concentração do produto de PCR do-

bra a cada ciclo durante a fase exponencial da reação. Contudo, muitas vezes a eficiência é inferior a 1, e o cálculo de expressão gênica feito sem a correção apropriada pode resultar em um valor acima do real. Por exemplo, no método comparativo de Ct descrito abaixo, se as eficiências de amplificação do gene-alvo e do gene de referência (padrão interno) não forem aproximadamente iguais, os cálculos podem fornecer resultados errôneos. Uma das maneiras de se ajustar a eficiência do padrão interno, por exemplo rRNA, é a redução da concentração de seus iniciadores e sonda.

Métodos de Cálculo de Quantificação Relativa

Um dos mais conhecidos é o método comparativo de C_t , em que a quantificação relativa de uma molécula-alvo em relação a amostras-controle, quando se utiliza um padrão interno, pode ser calculada a partir dos valores de C_t , da seguinte forma:

- Calcular a diferença entre os valores de C_t da sequência-alvo e do padrão interno para cada amostra (ΔC_t).
- Calcular a média de ΔC_t entre as amostras-controle do experimento.
- Calcular a diferença entre os valores de ΔC_t de cada amostra e o valor médio de ΔC_t das amostras-controle ($\Delta \Delta C_t$).
- O valor relativo de cada amostra é finalmente dado pela expressão $2^{-\Delta \Delta C_t}$. Um valor maior que 1 indica aumento da sequência-alvo nas amostras em estudo em relação às amostras controle, enquanto um valor menor que 1 indica redução.

Para facilitar a compreensão do cálculo, apresentamos no quadro 10.3 um exemplo de amplificação usando sondas TaqMan® e o equipamento ABI Prism 7700 (ABI Biosystems). Neste exemplo, em particular, a amplificação da sequência-alvo e do padrão interno foi realizada em tubos separados. Entretanto, o procedimento para os cálculos pode seguir o mesmo modelo abaixo no caso de reação simultânea em um único tubo.

Recentemente, outros métodos foram desenvolvidos, alguns dos quais utilizam uma planilha baseada no *software* Microsoft® Excel, por exemplo o REST® (*relative expression software tool*) e DART-PCR® (*Data Analysis for Real Time PCR*) disponíveis na página <http://www.corbettlifescience.com> ou www.gene-quantification.info. O primeiro (REST®) baseia-se no modelo de Pfaffl que combina quantificação e normalização do gene em um único cálculo. Este método de cálculo de expressão relativa inclui a correção de eficiência de amplifica-

ção do gene-alvo e o de referência ou controle interno. Além disso, tem a capacidade de calcular significância dos resultados e de indicar se o gene de referência usado é adequado para a normalização dos dados.

Quantidade Absoluta

Para análise quantitativa absoluta, é necessário estabelecer uma curva-padrão utilizando o DNA ou RNA da molécula-alvo. O uso de DNA como padrão parece resultar em maior sensibilidade, reprodutibilidade e estabilidade comparado ao uso de RNA. Contudo, padrões de DNA não podem ser utilizados em ensaios de RT-PCR realizados em um só passo devido à falta de um controle para a transcrição reversa. Uma das técnicas utilizadas consiste nas seguintes etapas: a) amplificação por PCR e clonagem em plasmídeo de um fragmento de cDNA que contenha a sequência-alvo; b) confirmação da sequência de cDNA obtida utilizando sequenciamento de bases; c) transcrição in vitro deste cDNA para a obtenção do cRNA; d) purificação do cRNA e cálculo do número de cópias tendo por base a quantidade total de RNA estimada por espectrofotometria. A curva-padrão pode então ser construída com diluições do cRNA (por exemplo, quantidades crescentes de 4×10^9 a 4×10^5 cópias de RNA em cada tubo). Em seguida, amostras e padrões são amplificados em triplicata em um mesmo ensaio. Traça-se a curva-padrão por meio de uma relação linear entre os valores de Ct e as quantidades iniciais de cRNA ou cDNA colocadas em cada tubo, extraíndo-se desta curva as quantidades de cada amostra baseadas no Ct. Este método assume

que todos os padrões e as amostras têm aproximadamente a mesma eficiência de amplificação (ver eficiência de amplificação acima).

Para se utilizar este método, deve-se ter o cuidado de manter as concentrações da curva-padrão dentro dos níveis esperados nas amostras estudadas, além de considerar os limites de detecção e precisão do equipamento e da reação.

Normalização

Tanto em quantificação absoluta quanto relativa, é necessária a inclusão de um controle que assegure a integridade de cada passo do processo de RT-PCR em tempo real. Em geral, um marcador fluorescente passivo (por exemplo ROX) é incluído na mistura máster de reagentes e serve para corrigir pequenas diferenças nos volumes de reação, assim como flutuações de sinal fluorescente não relacionadas à PCR. Contudo, ainda se faz necessária a correção para diferenças na quantidade de material inicial entre amostras, que pode variar não só pela massa de tecido ou número de células, mas também pela integridade individual do RNA. Utiliza-se, então, um padrão interno (gene de normalização) como controle interno da reação.

O padrão interno ideal deve manter sua expressão sempre constante, independente das condições ou tratamentos. Como ainda não foi identificado um padrão ideal, é necessário que se estude qual o padrão interno mais adequado para cada experimento, ou seja, aquele cuja expressão se mantenha constante, independente

Quadro 10.3 – Exemplo de cálculo de análise quantitativa relativa por PCR em tempo real.

Amostras	CNP (C _t)	β-Actina (C _t)	ΔC _t	ΔC _t Controle Média (C1-C4)	ΔΔC _t (ΔC _t - 12,72)	2 ^{-ΔΔC_t}	Quantidade Relativa (média)
C1	28,86	16,18	12,68	12,72	-0,04	1,03	1,00
C2	29,35	16,66	12,69		-0,03	1,02	
C3	29,65	16,70	12,96		0,23	0,85	
C4	29,37	16,82	12,56		-0,17	1,12	
DB1	25,60	16,25	9,36		-3,37	10,30	8,80
DB2	25,84	16,11	9,74		-2,99	7,92	
DB3	25,44	15,87	9,57		-3,15	8,88	
DB4	25,45	15,75	9,70		-3,02	8,11	

C1 - C4: amostras de RNA extraído de cultura de células FRTL-5-controle; DB1 a DB4: RNA extraído de células FRTL-5 tratadas com dibutiril-AMP cíclico por 24 h. A quantificação relativa pode ser expressa pela média de 2^{-ΔΔC_t} das amostras tratadas em relação à média do controle (que deve ser igual a 1).CNP: peptídeo natriurético tipo C. β-actina: utilizada como padrão interno para a normalização das amostras.

das condições experimentais, antes de utilizá-lo para normalizar os resultados. Tradicionalmente, utilizam-se os genes *housekeeping* (GAPDH, β -actina) para normalização dos dados. Entretanto, já se demonstrou que a expressão destes genes pode ser alterada em várias condições e, conseqüentemente, a normalização com um determinado gene *housekeeping* pode resultar em dados falsos. Portanto, é fundamental a validação da estabilidade do controle interno antes de utilizá-lo.

Os genes de RNA ribossômicos vêm sendo recomendados como controle interno, sendo o rRNA 28S mais representativo da integridade do mRNA, porque o 18S pode se manter íntegro mesmo quando há degradação do mRNA. É, no entanto, um dos padrões internos que se mantém inalterado nos vários tecidos e condições experimentais. Porém, há algumas considerações que devem ser levadas em conta: o rRNA não tem terminação poli-A e portanto não poderá ser medido em ensaios em que se use transcrição reversa com iniciador oligo(dT), devendo-se portanto usar iniciadores randômicos (*random primers*) e sua concentração no RNA total é muito alta, exigindo um ajuste das concentrações de seus iniciadores e sonda, para que sua eficiência de amplificação se assemelhe à dos genes em estudo.

Quando há dificuldade de identificar um padrão interno adequado, alguns autores recomendam a normalização dos valores obtidos por meio da quantidade de RNA total utilizada na reação. Neste sentido, a determinação da concentração de RNA deve ser a mais precisa possível. Medidas utilizando espectrofotometria convencional são muito utilizadas, contudo, esta metodologia não oferece a sensibilidade nem a precisão necessárias. Medidas mais precisas e sensíveis podem ser obtidas com o uso do corante RiboGreen® RNA (Molecular Probes, USA) associado ao NanoDrop (ND-3300, NanoDrop Technologies, USA) ou com equipamentos como o Agilent 2100 Bio Analyzer (Agilent Technologies, USA) e Experion (Bio-Rad Laboratories, USA).

Sensibilidade e Reprodutibilidade do Ensaio de PCR em Tempo Real

Em um estudo utilizando 30 amostras, a comparação entre o ensaio de proteção à RNase e PCR em tempo real utilizando a técnica TaqMan® forneceu uma correlação significativa ($r = 0,62$, $p < 0,001$) entre os resultados obtidos pelos dois métodos, mas a técnica TaqMan® apresentou sensibilidade cerca de 10^5 vezes mais elevada.

O método de PCR em tempo real tem excelente reprodutibilidade. Análise de vários estudos utilizando diferentes técnicas e equipamentos mostra valores entre 0,06 a 1,7% e 0,4 a 2,6%, respectivamente para a variação intra e interensaio.

Cuidados Gerais com a Reação

A PCR em tempo real é uma ferramenta muito potente de amplificação de DNA, portanto, a precisão é muito importante para que se obtenham resultados confiáveis. Neste sentido, recomendam-se os seguintes cuidados:

- Certificar-se de que está usando a técnica correta e metódica de pipetagem de reagentes.
- Manter as pipetas calibradas.
- Preparar a reação em ambiente livre de contaminação com DNA ou outros agentes químicos (uso de capela, sem fluxo de ar, de preferência). Há quem preconize usar um avental exclusivamente para a manipulação de PCR em tempo real, a fim de evitar contaminação da reação com outros produtos.
- Limpar o local de trabalho, incluindo centrífugas e misturadores, com frequência.
- Quando estiver utilizando marcadores fluorescentes diferentes na mesma reação, trocar de luvas entre a manipulação dos diferentes marcadores.
- Ao término da reação no termociclador, **não** abrir os tubos de PCR no ambiente onde a reação é preparada (de preferência, descartar os tubos seguramente fechados em local fora de onde fica a bancada de trabalho).
- Para reduzir a degradação de reagentes por múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento, recomendam-se dividir os reagentes em várias alíquotas.
- É ainda válido enfatizar que o marcador fluorescente é sensível à luz e, portanto, sujeito a fotodegradação. Então, é conveniente manter o reagente fluorescente em ambiente escuro até o momento imediatamente anterior a sua utilização, podendo este ser o último componente adicionado à mistura da reação.
- Otimizar a concentração dos iniciadores, sondas e RNA ou DNA para cada molécula-alvo a ser amplificada.

Outras fontes de variação podem ainda ser encontradas, mesmo quando consideramos uma mesma amostra, mesmo laboratório, mesmo equipamento e um único conjunto de pipetas. Assim sendo, ao compararmos resultados de PCR em tempo real, devemos considerar: número de lote dos reagentes, tempo de estoque de sondas fluorescentes e de enzimas (degradação), sondas sintetizadas por diferentes fabricantes e, finalmente, reações realizadas por diferentes pesquisadores (diferentes graus de experiência). Portanto, para se obter um resultado confiável, deve-se estar atento a todas estas variáveis. Uma estratégia bastante útil é incluir um mesmo controle ou curva-padrão em cada placa de PCR em tempo real, especialmente quando um novo lote de reagentes for utilizado.

É ainda muito importante lembrar que há metodologias que requerem reagentes específicos, e o uso indiscriminado de reagentes em diferentes técnicas pode acarretar resultados incorretos ou não confiáveis. Por exemplo, os reagentes da ABI Biosystems foram padronizados para os equipamentos da própria companhia e incluem um padrão interno de fluorescência (ROX), imprescindível para o sistema *laser*, mas que interfere com o sistema de detecção por filtros utilizado em outros equipamentos, como o termociclador iCycler (BioRad).

Referências

- Bustin SA: Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 2002, 29: 23-39.
- Dobrowolski SF, Angeletti J, Banas RA, and Naylor EW: Real time PCR assays to detect common mutations in the biotinidase gene and application of mutational analysis to newborn screening for biotinidase deficiency. *Mol Genet Metab* 2003, 78: 100-107.
- Fleige S and Pfaffl MW: RNA integrity and the effect on the real-time Q_{rt}-PCR performance. *Mol Aspects Méd* 2006, 27:126-139.
- Gelmini S, Orlando C, Sestini R, Vona G, Pinzani P, Ruocco L, and Pazzagli M: Quantitative polymerase chain reaction-based homogeneous assay with fluorogenic probes to measure c-erb-2 oncogene amplification. *Clin Chem* 1997, 43(5): 752-758.
- Gibson UEM, Heid CA, and Williams PM: A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996, 6(10): 995-1001.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, and Williams PM: Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996, 6(10): 986-994.
- Hernández M, Pla M, Esteve T, Prat S, Puigdomenech P, and Ferrando A: A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize Yield-Gard® based on the 3'-transgene integration sequence. *Transg Res* 2003, 12: 179-189.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, and Gelfand DH: Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1991, 88: 7276-7280.
- Jebbink J, Bai X, Rogers BB, Dawson DB, Scheuermann RH, and Domiati-Saad R: Development of real-time PCR assays for the quantitative detection of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus, comparison of TaqMan probes and molecular beacons. *J Mol Diagn* 2003, 5(1): 15-20.
- Kumar S, Reed MW, Gamper HB, Jr, Gorn VV, Lukhtanov EA, Foti M, West J, Meyer RB, Jr, and Schweitzer BI: Solution structure of a highly stable DNA duplex conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res* 1998, 26(3): 831-838.
- Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW, Meyer RB, and Hedgpeth J: 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* 2000, 28(2): 655-661.
- Kühne BS and Oschmann P: Quantitative real-time RT-PCR using hybridization probes and imported standard curves for cytokine gene expression analysis. *Biotechniques* 2002, 33(5): 1078-1089.
- Mane VP, Heuer MA, Hillyer P, Navarro MB, and Rabin RL: Systematic method for determining an ideal housekeeping gene for real-time PCR analysis. *J Biomol Techniques* 2008, 19: 342-347.
- Martell M, Gómez J, Esteban JI, Sauleda S, Quer J, Cabot B, Esteban R, and Guardia J: High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA. *J Clin Microbiol* 1999, 37(2): 327-332.
- Persson K, Hamby K, and Ugozzoli LA: Four-color multiplex reverse transcription polymerase chain reaction-overcoming its limitation. *Anal Biochem* 2005, 344: 33-42.
- Saha BK, Tian B, and Bucy RP: Quantitation of HIV-1 by real-time PCR with a unique fluorogenic probe. *J Virol Meth* 2001, 93: 33-42.
- Sellitti DF, Puggina E, Lagranha C, and Doi S: cAMP inhibits C-type natriuretic peptide receptor-B activity and increases C-type natriuretic peptide in FRTL-5 rat thyroid cells. *J Endocrinol* 2004, 180(1):23-34.
- Stubner S: Enumeration of 16S rDNA of *Desulfotomaculum* lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with

- SybrGreenTM detection. *J Microbiol Meth* 2002, 50: 155-164.
- Szuhai K, Sandhaus E, Kolkman-Uljee SM, Lemaitre M, Truffert J-C, Dirks RW, Tanke HJ, Fleuren GJ, Schuur E, and Raap AK: A novel strategy for human papillomavirus detection and genotyping with SybrGreen and molecular beacon polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 2001, 159(5): 1651-1660.
- Vet JAM, Majithia AR, Marras SAE, Tyagi S, Dube S, Poiesz BJ, and Kramer FR: Multiplex detection of four pathogenic retroviruses using molecular beacons. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1999, 96: 6394-6399.
- Wang T and Brown MJ: mRNA quantitation by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection. *Anal Biochem* 1999, 269: 198-201.
- Whitcombe D, Theaker J, Guy SP, Brown T, and Little S: Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat Biotechnol* 1999, 17: 804-807.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN, and Elenitoba-Johnson KSJ: Real-time multiplex PCR assays. *Methods* 2001, 25: 430-442.
- Wong ML and Medrano JF: Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 2005, 39: 75-85.
- Zhu L-J and Altmann SC: mRNA and 18S-RNA coapplication-reverse transcription for quantitative gene expression analysis. *Anal Biochem* 2005, 345: 102-109.

11. Prevenção da Contaminação nas Reações de Amplificação de Ácidos Nucleicos

Rozangela Verlengia
Rosario Dominguez Crespo Hirata
Mário Hiroyuki Hirata

Introdução

A amplificação de ácidos nucleicos *in vitro* tem proporcionado um avanço significativo na biologia molecular e na genética, possibilitando a clonagem de genes, a pesquisa de mutações e polimorfismos, a detecção de microrganismos em diferentes amostras biológicas e outras aplicações (Duncan, 1981; Ehrlich e Greenberg, 1994; Lee, Morse e Olsvik, 1997).

A reação em cadeia de polimerase (PCR), descrita por SAIKI et al. (1985) e Mullis e Faloona (1987), é a reação de amplificação de ácido nucleico mais utilizada. A PCR compreende a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de ácido desoxirribonucleico (DNA) de fita dupla (ds, *double strand*) ou fita simples (ss, *single strand*) e, com o uso da transcriptase reversa, o ácido ribonucleico (RNA) também pode ser amplificado. A reação é baseada na desnaturação da fita dupla do ácido nucleico, seguida da hibridização de dois iniciadores oligonucleotídicos que flanqueiam as extremidades da região a ser amplificada, e posterior síntese da nova cadeia polinucleotídica pela adição de nucleotídeos na extremidade 3'-OH livre (hidroxila livre), por meio da DNA polimerase.

Dessa forma, cada ciclo da PCR consiste de três etapas: desnaturação, hibridização e amplificação. A fita sintetizada serve como molde para uma subsequente reação de amplificação, de modo que após repetidos ciclos ocorre o acúmulo exponencial do segmento de ácido nucleico de interesse. O número de moléculas do segmento do ácido nucleico-alvo teoricamente dobra em cada ciclo, por exemplo uma PCR com 20 ciclos gera aproximadamente 1 milhão de vezes a quantidade da sequência-alvo presente inicialmente (Gelfand et al., 1990).

A PCR, portanto, apresenta-se como uma técnica potencialmente sensível, possibilitando detectar até uma única molécula de ácido nucleico. Sua sensibilidade

de pode ser aumentada pelo uso da PCR-dupla (*nested-PCR*), na qual o produto amplificado é submetido a um segundo processo de amplificação utilizando um conjunto de iniciadores homólogos a sequências internas do segmento já amplificado (Ehrlich, Greenberg e Sninsky, 1991; Ehrlich e Greenberg, 1994). Este procedimento torna a reação da PCR mais específica e sensível. A primeira aplicação dessa estratégia foi a amplificação do gene da β -globina humana com o uso da enzima fragmento Klenow (Mullis e Faloona, 1987).

O aumento de especificidade e sensibilidade da reação da PCR foi alcançado com o uso de DNA polimerases isoladas de organismos termófilos, que catalisam a reação de polimerização a elevadas temperaturas, favorecendo a estringência e a especificidade requeridas nas reações de amplificação de DNA. O uso dessas enzimas eliminou muitos dos produtos de amplificação inespecíficos observados com o emprego da enzima fragmento Klenow, primeira enzima utilizada na reação da PCR. A utilização da DNA polimerase termoestável simplificou o procedimento da PCR, permitindo que todos os reagentes fossem adicionados ao mesmo tempo no tubo de reação (Ehrlich e Greenberg, 1994).

A DNA polimerase termoestável mais usada na PCR é a *Taq* DNA polimerase, introduzida, em 1988, por Saiki et al., isolada a partir da eubactéria termofílica - *Thermus aquaticus* linhagem YT (Brock e Freeze, 1969). A atividade ótima de polimerização é alcançada entre 75 e 80°C, e a termoestabilidade – medida como a meia-vida de atividade enzimática –, entre 45 e 96 minutos a 95°C (Abramson, 1995).

Atualmente, há várias DNA polimerases termoestáveis disponíveis no mercado, com termoestabilidade, atividade exonucleásica e taxa de incorporação de nucleotídeos variáveis, que possibilitam explorar suas características particulares para diversas aplicações.

Nas reações de amplificação com DNA molde rico em nucleotídeos G+C, em que a temperatura de desnaturação elevada é exigida, as DNA polimerases mais termo-resistentes são mais adequadas, enquanto enzimas com alta velocidade de síntese são mais empregadas para a amplificação de fragmentos longos (Abramson, 1995).

As principais vantagens do uso dos métodos de amplificação de ácidos nucleicos são a alta especificidade e a alta sensibilidade das reações. Embora a sensibilidade seja um aspecto positivo, essa característica traz à tona uma problemática na aplicação dessas técnicas nos laboratórios de Biologia Molecular, que é a fidelidade dos resultados, principalmente devido a possíveis resultados falso-positivos provenientes de diversas fontes de contaminação.

Fontes de Contaminação

Dentre as principais fontes de contaminação temos: DNA proveniente de amostras clínicas contendo grande número de organismos; DNA proveniente de microrganismos mantidos em cultura; e DNA isolado de materiais experimentais tais como clones recombinantes ou produtos de PCR gerados a partir de amplificações prévias da mesma sequência-alvo. A contaminação por produtos de PCR, denominada *PCR-carryover*, representa a principal fonte de contaminação dentro do laboratório que utiliza técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (Kitchin e Bootman, 1993; Meier et al., 1993; Persing, 1991).

A superfície das áreas do laboratório e de equipamentos (cubas de eletroforese, microcentrífugas, termociclador, transiluminador, aparelhos de transferência de ácido nucleico *dot blot*, *Southern blotting* ou *Northern blotting* entre outros) são considerados veículos de contaminação, quando há ácido nucleico contaminante nesses locais (Kwok e Higuichi, 1989; Neumaier, Braun e Wagener, 1998).

A detecção de resultados falso-positivos é essencial e inclui o uso de reações-controle com amostras negativas, bem como reações utilizando somente os reagentes da PCR, denominadas controle de reagente. O uso desses controles permite assegurar, principalmente nas amostras negativas, a fidelidade dos resultados. Por outro lado, o uso de reações-controle com amostras positivas também faz-se necessário, uma vez que a presença de inibidores presentes na amostra pode bloquear a reação de amplificação, gerando resultados falso-negativos.

Prevenção da Contaminação

A prevenção e o controle da contaminação nos laboratórios de Biologia Molecular não somente reduz o risco potencial da obtenção de resultados errôneos, como também, permite assegurar a reprodutibilidade dos ensaios.

A separação física das principais etapas envolvidas no processamento das amostras e na execução das técnicas de amplificação já se tornou um consenso dentro da comunidade científica para evitar esse tipo de contaminação (Kwok e Higuichi, 1989; Neumaier, Braun e Wagener, 1998). Para minimizar as fontes de contaminação, preconiza-se a delimitação de quatro áreas de trabalho no laboratório de amplificação de ácidos nucleicos: a sala de preparo de reagentes, a sala de preparo de amostras, a sala de amplificação e a sala de detecção dos produtos de amplificação. Cada área deve ter equipamentos, reagentes e materiais (pipetas, centrífugas, congeladores, geladeiras, luvas, ponteiras, tubos de microcentrífuga, canetas, aventais e outros) próprios, de forma que não haja troca de materiais entre as áreas de trabalho. O acesso às áreas individuais deverá seguir uma sequência de fluxo positivo, ou seja, proceder em um único sentido, da área de armazenamento e preparo de reagentes para a área de análise de produtos de PCR. Outro aspecto importante é a limpeza do laboratório, que deve seguir o mesmo fluxo. Os utensílios de limpeza deverão ser individuais para cada área de trabalho, evitando a troca entre elas (Neumaier, Braun e Wagener, 1998).

Associado à separação física das áreas de trabalho, os analistas devem ser corretamente treinados e trabalhar de acordo com as boas práticas de laboratório, ou seja, devem usar máscaras, luvas, tocas, aventais e outros equipamentos de proteção individual. Isso se faz necessário, pois o analista pode carregar contaminantes de DNA na superfície da pele que foram adquiridos ao entrar na área de pós-PCR, preparo de amostra ou de clonagem (Kitchin et al., 1990).

A adoção desses critérios auxilia a evitar contaminação, principalmente no caso de amostras com alto número de cópias e de fragmentos clonados, mas não são suficientes. Dessa forma, é necessário o emprego de procedimentos de descontaminação para prevenção e controle da contaminação nas reações de amplificação de ácidos nucleicos.

Processos de Descontaminação

Das Áreas de Trabalho

Reagentes Químicos – a superfície das bancadas e de equipamentos representam uma fonte potencial de contaminação devido à presença de ácido nucleico residual, proveniente de manipulação de amostras e análise de produtos amplificados. Para o uso do transiluminador, indica-se cobrir a superfície com plástico antes de visualizar cada gel (Kwok e Higuichi, 1989).

A eliminação de resíduos de ácidos nucleicos dessas superfícies com reagentes químicos é uma medida eficaz para minimizar a contaminação (Kwok e Higuichi, 1989; Prince e Andrus, 1992). Tem sido recomendado o uso de HCl a 1 M (Kwok e Higuichi, 1989) e hipoclorito a 10% (Prince, 1991). O hipoclorito é o mais usado devido a sua menor toxicidade e menor ação corrosiva (Prince, 1991). Nas superfícies metálicas, recomenda-se o uso dos álcoois etílico a 70% e o isopropílico a 70%, normalmente empregados nos procedimentos de desinfecção, por apresentarem atividade rápida sobre bactérias, fungos e vírus lipofílicos (Romão, 1998).

Esses reagentes devem ser manuseados com cuidado, pois apresentam efeitos adversos. O hipoclorito e o ácido clorídrico são tóxicos, irritantes e corrosivos. Quando ingeridos, provocam irritação e corrosão das membranas mucosas, e quando inalados podem causar irritação grave do trato respiratório (Romão, 1998). O etanol e o isopropanol são tóxicos e irritantes para os olhos e seu uso frequente produz irritação e dessecação da pele (Romão, 1998).

Radiação ultravioleta – a luz ultravioleta (UV) provoca danos letais e mutagênicos nos ácidos nucleicos dos organismos expostos (Setlow, 1966; Wang, 1976a; Wang, 1976c). A radiação UV com comprimento de onda de 260 nm é absorvida fortemente pelas bases nitrogenadas dos ácidos nucleicos, em maior grau pelas pirimidinas, produzindo dímeros de timina-timina ($T \leftrightarrow T$), timina-citosina ($C \leftrightarrow T$) e citosina-citosina ($C \leftrightarrow C$) (Setlow, 1966; Wang, 1976b e Wang, 1976c). Os principais fotoprodutos são dímeros de ciclobutano de pirimidinas adjacentes (Fig. 11.1).

Estas alterações previnem a replicação do DNA por prejudicar o pareamento das bases durante a síntese do ácido nucleico pela DNA polimerase. Contudo, a formação dos dímeros é reversível, estabelecendo-se um equilíbrio que favorece a formação de monômeros sobre a dos dímeros. Dessa forma, menos de 10% de dímeros de pirimidinas existe no DNA irradiado uma única vez (Gordon e Haseline, 1982).

A radiação UV sobre o DNA seco, bem como em soluções de reagentes, tem sido proposta como método para prevenir contaminação nas reações de amplificação de ácidos nucleicos (Fairfax et al., 1991; Setlow, 1966).

Sarkar e Sommer (1990) foram os primeiros a relatar o uso da radiação UV para o controle da contaminação na PCR. Esses investigadores observaram que a irradiação de amostras de DNA com UV (254 e 300 nm), por 5 a 20 minutos, impedia a amplificação do DNA por PCR. Fox et al. (1991) avaliaram a eficiência da radiação UV em eliminar a contaminação de produtos de amplificação de 149 bp e 357 bp do genoma do citomegalovírus (CMV) e de sequências de 551 bp do genoma do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os autores observaram que a radiação UV foi eficiente em eliminar a contaminação provocada intencionalmente por esses produtos de PCR.

Considerando que as bases pirimidínicas absorvem a radiação UV com maior intensidade, é possível que os fragmentos que possuem maior número dessas bases sejam danificados com mais facilidade (Setlow, 1966;

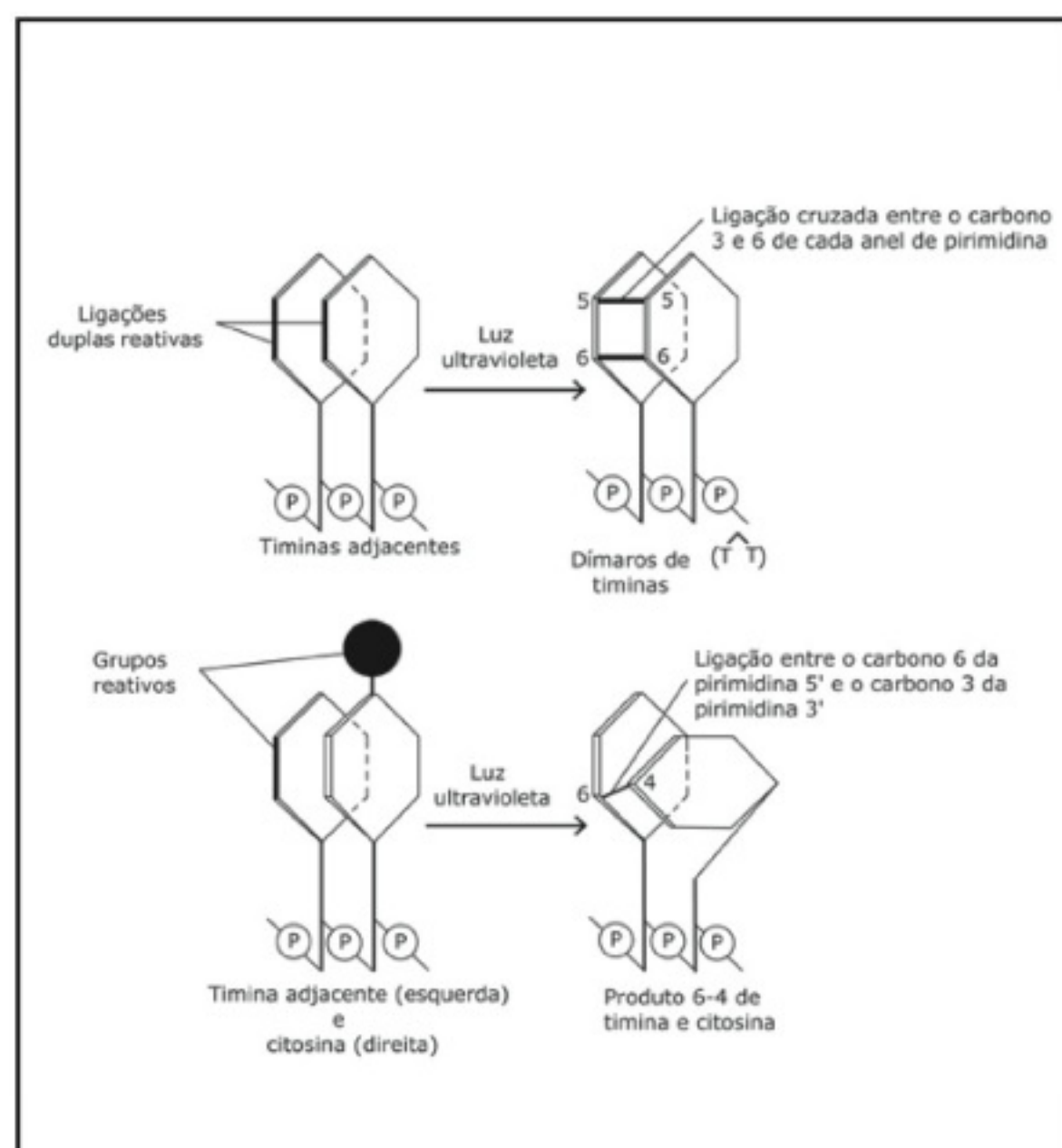


Figura 11.1 – Representação esquemática de dois importantes dímeros de pirimidinas e de fotoprodutos da radiação UV (adaptado de Watson et al., 1987).

Wang, 1976b e 1976c). Com base em considerações teóricas e dados experimentais limitados, sequências com menos que 10 sítios dimerizáveis poderão ser resistentes à radiação UV (Fairfax et al., 1991; Gordon e Haseline, 1982; Meier et al., 1993).

Cabe ressaltar que a eficiência da radiação UV sobre as superfícies do laboratório é limitada, pois a capacidade máxima de esterilização é alcançada quando as superfícies são perpendiculares à origem da fonte de UV. Entretanto, as superfícies dos equipamentos, na maioria das vezes, são inclinadas ou paralelas à fonte de UV (Cone e Fairfax, 1995).

A utilização da radiação UV deve ser realizada com cuidado, uma vez que é mutagênica e pode causar perda ou diminuição da visão. Recomenda-se o uso de luvas e cobrir a pele quando trabalhar com a radiação UV (Cone e Fairfax, 1995).

Da Reação de PCR

Pré-amplificação – o uso de nucleases, enzimas que hidrolisam os ácidos nucleicos, no pré-tratamento de produtos de PCR possibilita eliminar a contaminação por *carryover* (Furrer et al., 1990; Longo, Berninger e Hartley, 1990; Rys e Persing, 1993; Walder, Hayes e Walder, 1993). O uso deste procedimento está baseado no princípio de que os iniciadores oligonucleotídeos, bem como o RNA (fita simples), são resistentes a endonucleases de restrição, porém ácidos nucleicos de fita dupla com sítios de clivagem conhecidos (preferencialmente múltiplos) poderão ser eficientemente hidrolisados e não amplificados. Esse método é utilizado na esterilização de pré-amplificação.

As DNA glicosilases participam no processo de reparo do DNA, catalisando a remoção de bases não convencionais ou danificadas na molécula de DNA. Essas enzimas promovem a hidrólise da ligação N-glicosídica (ligação açúcar/base), resultando na produção de sítios apurínicos/apirimidínicos (AP) no DNA e uma base livre (Fig. 11.2). Os sítios apurínicos/apirimidínicos resultantes são subsequentemente reparados pelas DNA polimerase e ligase (Duncan, 1981).

A uracila N-glicosilase (UNG) é a mais abundante de todas as glicosilases presentes na célula. A UNG remove resíduos de uracila da molécula de DNA, que resultam da incorporação errada de resíduos dUMP pela DNA polimerase da deaminação da citosina. Os produtos são bases uracila livre, sendo que o comprimento das cadeias não se altera, contudo passa a conter sítios apirimidínicos. Além disso, a enzima UNG não apre-

senta nenhuma atividade sobre o dUMP livre ou sobre o RNA (Fig. 11.3) (Duncan, 1981; Lindahl, 1982).

A utilização da UNG no controle da contaminação por *carryover*, na PCR, foi introduzido por Longo et al., em 1990. Esses autores mostraram que os produtos de PCR, gerados por reações nas quais o dTTP foi substituído pelo dUTP e incubados com a enzima UNG, não eram viáveis como molde para reações de amplificação posteriores.

Experimentos realizados para avaliar a influência da UNG sobre a amplificação indicaram que ela não é inativada durante o processamento da PCR e que sua atividade residual pode potencialmente degradar o produto de PCR em determinadas condições (Thornton, Hartley e Rashtchian, 1992). Portanto, as reações de PCR tratadas com UNG devem permanecer a 72°C, temperatura na qual a enzima possui atividade mínima. A UNG não se aplica aos métodos de *nested-PCR*, uma vez que destruiria o produto de PCR proveniente da primeira amplificação que contém dUTP na sua sequência.

Pós-amplificação – os reagentes fotoquímicos, utilizados nos estudos de estrutura e função dos ácidos nucleicos, têm sido empregados para a destruição de produtos de PCR.

Os psoralenos compreendem a classe de reagentes fotoquímicos mais utilizada na caracterização de ácidos nucleicos virais, bacterianos ou de eucariotos. Também são usados em estudos funcionais de RNAs nucleares pequenos e no processamento de RNA heteronuclear (Cimino et al., 1985). Estruturalmente, os psoralenos são compostos tricíclicos formados por meio da fusão linear de um anel de furano com uma cumarina (Cimino et al., 1985) (Fig. 11.4).

Os psoralenos reagem primariamente com timidina no DNA e uridina no RNA. Esses compostos contêm duas ligações duplas reativas que, quando excitadas com radiação (320 a 400 nm), reageam com a ligação dupla 5-6 da pirimidina e formam anéis de ciclobutano (Cimino et al., 1985).

Vários trabalhos têm mostrado o uso dos psoralenos e seus derivados no controle da contaminação com ácidos nucleicos nas reações da PCR (Cimino et al., 1991; Isaacs et al., 1991). Cimino et al. (1991) avaliaram o uso de 4'-aminometil-4,5-dimetil-isopsoraleno (4'-AMDMIIP) como agente fotoquímico esterilizante na reamplificação de 10⁶ cópias do produto de PCR (115bp) do DNA do HIV. Após a adição do 4'-AMDMIIP e da irradiação com UV, não foram observados produtos de amplificação. Este estudo evidenciou que o 4'-AMDMIIP pode ser utilizado

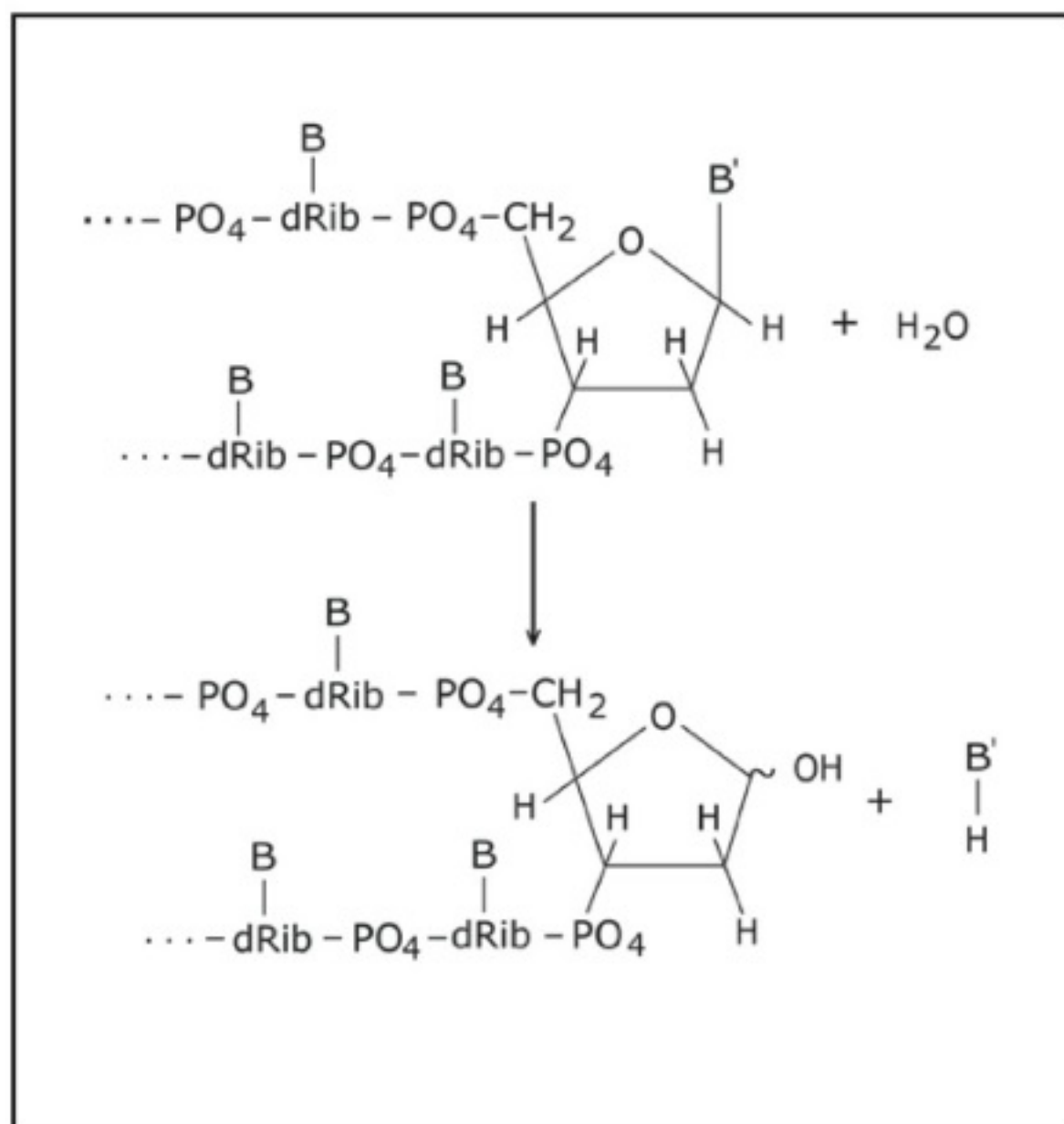


Figura 11.2 – Reação da DNA glicosilase. A base não usual ou danificada (B') é removida da molécula de DNA pela hidrólise da ligação N-glicosídica da deoxirribose produzindo uma base livre e um sítio AP na posição ocupada pela base (adaptado de Duncan, 1981).

como método eficaz para o controle de contaminação *carryover*. Observou-se também que a eficiência do uso dos derivados do psoraleno, 4'-AMDMIP e AMIP, no controle da contaminação de amplicons do HIV guardou uma relação direta entre a concentração do reagente empregado e o número de cópias a ser amplificado. Adicionalmente, o uso de cossolventes (dimetilsulfóxido e sulfato sódico de duodecil) associados a esses reagentes aumentou a eficiência da PCR (Cimino et al., 1991). Cuidado deve ser tomado durante a manipulação desses reagentes fotoquímicos, uma vez que os psoralenos são agentes tóxicos potenciais em animais e humanos (Kornhauser, Waner e Giles, 1982).

Em conclusão, os resíduos de ácidos nucleicos, principalmente os produtos gerados pela PCR, representam uma fonte significativa de contaminação, podendo gerar resultados falso-positivos nos laboratórios que utilizam as técnicas de amplificação de ácidos nucleicos. A separação física das áreas de trabalho e os processos físicos e químicos de descontaminação são medidas efetivas de prevenção e controle da contaminação potencial gerada pelo uso dessa tecnologia.

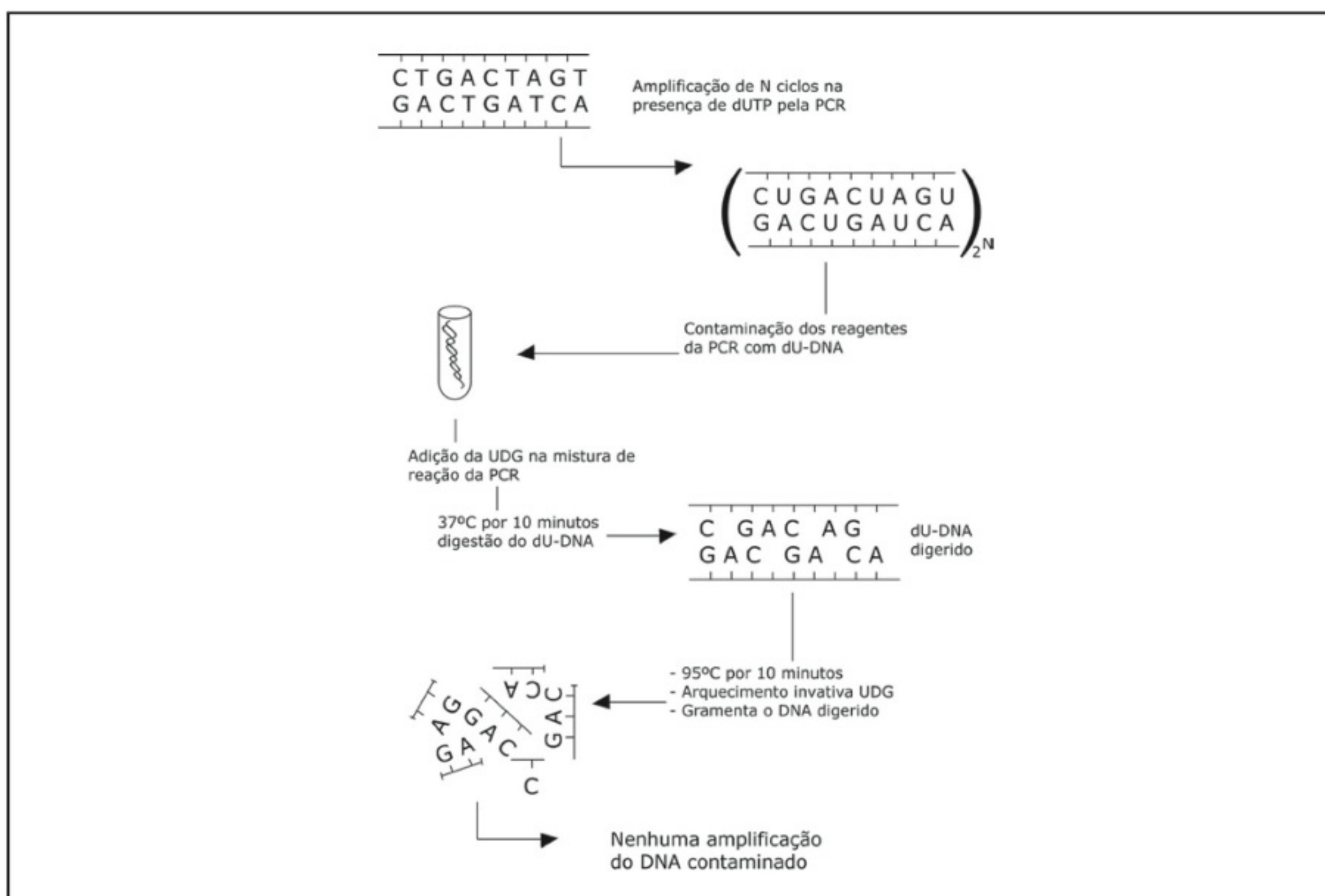


Figura 11.3 – Representação esquemática do procedimento dUTP/uracil-N-glicosilase, na PCR (adaptado de HARTLEY e RASHTCHIAN, 1995).

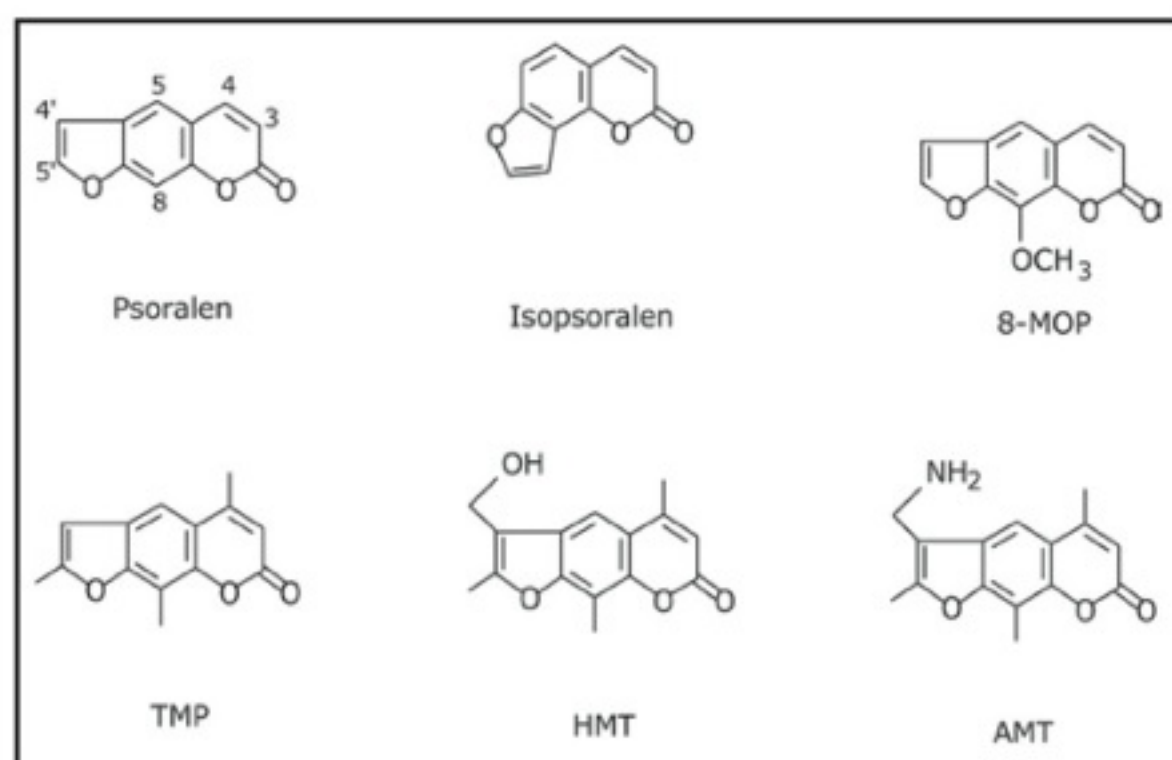


Figura 11.4 – Estrutura e sistema de numeração usado para o psoraleno, isopsoraleno (angelicino), 8-metoxipsoraleno (8-MOP), 4,5,8-trimetilpsoraleno (TMP), 4'-hidroximetil-4,5,8-trimetilpsoraleno (HMT) e 4'-aminometil, 4,5,8-trimetilpsoraleno (AMT) (adaptado de Cimino et al., 1985).

Referências

- Abramson, R.D. Thermostable DNA polymerases In: Innis, M.A.; Gelfand, D.A.; Sninsky J.J., eds. PCR Strategies. São Diego: Academic Press, 1995. p. 39-57.
- Brock, T.D.; Freeze, H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a non-sporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol.*, 98: 289-297, 1969.
- Cimino, G.D.; Metchette, K.C.; Tessaman, J.W.; Hearst, J.E.; Isaacs, S.T. Post-PCR sterilization: a method to control carryover contamination for the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.*, 19: 99-107, 1991.
- Cimino, G.D.; Gamper, H.B.; Isaacs, S.T.; Hears, T.J. Psoralenos as photoactive probes of nucleic acid structure and function: organic chemistry, photochemistry, and biochemistry. *Ann. Rev. Biochem.*, 54: 1151-1193, 1985.
- Cone, R.W.; Fairfax, M.R. Ultraviolet irradiation of surfaces to reduce PCR contamination. In: Dieffenbach Carl, W.; Dveksler, G.S., eds.: PCR Primer. A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1995. p. 31-5.
- Duncan, B.K. DNA glycosylases In: Boyer, P., ed. *The Enzymes*. 3rd. ed. New York: Academic Press, 1981. Part A, p. 565-586.
- Ehrlich, G.D.; Greenberg, S.J. PCR-based diagnostics. In: *Infectious Disease*. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1994, 698p.
- Ehrlich, G.D.; Greenberg, S.J.; Sninsky, J.J. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*, 252:1643-50, 1991.
- Fairfax, M.R.; Metcalf, M.A.; Cone, R.W. Slow inactivation of dry PCR templates by UV light. *PCR Methods Appl.*, 1: 142-143, 1991.
- Fox, J.C.; Khaled-Ait, M.; Webster, A.; Emery, V.C. Elimination PCR contamination: is UV irradiation the answer? *J. Virol. Methods.*, 33:375-382, 1991.
- Furrer, B.; Candrian, U.; Wieland, P.; Luthy J. Improving PCR efficiency. *Nature*, 346:324, 1990.
- Gelfand, D.H.; White, T.J. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J., eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. São Diego: Academic Press, 1990, p. 129.
- Gordon, L.K.; Haseline, W.A. Quantitation of cyclobutane pyrimidine dimer formation in double- and single-stranded DNA fragments of defined sequence. *Radioat. Res.*, 89: 99-112, 1982.
- Hartley, J.L.; Rashtchian, A. Enzymatic control of carryover contamination in PCR. In: Dieffenbach Carl, W.; Dveksler, G.S., eds. PCR Primer. A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1995, p. 23-29.
- Isaacs, S.T.; Tessman, J.W.; Metchette, K.C.; Hearst, J.E.; Cimino, G.D. Post-PCR sterilization: development and application to an HIV-1 diagnostic assay. *Nucleic Acids Res.*, 19:109-116, 1991.
- Kitchin, P. A.; Szotyori, Z; Fromholz, C.; Almond, N. Avoidance of false positives. *Nature*, 344:201, 1990.
- Kitchin, P.A.; Bootman, J.S. Quality control of the polymerase chain reaction. *Med. Virol.*, 3:107-114, 1993.
- Kornhauser, A.; Waner, W.G.; Giles, A.L. Psoralen phototoxicity: correlation with serum and epidermal 8-methoxypsoralen and 5-methoxypsoralen in the Guinea Pig. *Science*, 217:733-735, 1982.
- Kwok, S; Higuichi, R. Avoiding false positive with PCR. *Nature*, 339:237-238, 1989.
- Lee, H.; Morse S.; Olsvik, O. Nucleic acid amplification technologies. Application to Disease Diagnosis, Boston: Biotechniques Books, 1997, 286p.
- Lindahl, T. DNA repair enzymes. *Annu. Rev. Biochem.*, 51:61-84, 1982.
- Longo, M.C.; Berninger, M.S.; Hartley, J.L. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*, 93:125-128, 1990.
- Meier, A.; Persing, D.H.; Finken, M.; Böttger, E.C. Elimination of contaminating DNA within polymerase chain reaction reagents implications for a general approach to detection of uncultured pathogens. *J. Clin. Microbiol.*, 31: 646-652, 1993.
- Mullis, K.B.; Faloona, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155: 335-350, 1987.
- Neumaier, M.; Braun, A.; Wagener, C. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. *Clin. Chem.*, 44:12-26, 1998.

- Persing, D.H. Polymerase chain reaction: trenches to benches. *J. Clin. Microbiol.*, 29:1281-1285, 1991.
- Prince, A.M.; Andrus, L. PCR: how to kill unwanted DNA. *Biotechniques*, 12:358-360, 1992.
- Romão C.M.C.A. Desinfecção e esterilização química. In: Teixeira P.; Valle S. Biossegurança. Uma Abordagem Multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz Editora, 1998, p. 133-162.
- Rys, P.N.; Persing, D.H. Preventing false positives: quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products. *J. Clin. Microbiol.*, 31:2356-2360, 1993.
- Saiki, R.K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K.B.; Horn, G.T.; Erlich, H.A.; Arnheim, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230:1350-1354, 1985.
- Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K.B.; Erlich, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487-644, 1988.
- Sarkar, G.A.; Sommer, S.S. Shedding light on PCR contamination. *Nature*, 343:27, 1990.
- Setlow, J.K. The molecular basis of biological effects of ultraviolet radiation an photo-reactivation. In: Michael, K.E.; Howard, A., eds. *Currents Topics in Radiation Research*. Amsterdam. North-Holland Publishing, 1966, p. 196-247.
- Thornton, C.G.; Hartley, J.L.; Rashtchian, A. Utilizing uracil DNA glycosylase to control carryover contamination in PCR: characterization of residual UNG activity following thermal cycling. *Biotechniques*, 13:180-183, 1992.
- Walder, R.Y.; Hayes, J.R.; Walder, J.A. Use of PCR primers containing a 3'-terminal ribose residue to prevent cross-contamination of amplification sequences. *Nucleic Acids Res.*, 21:4339-4343, 1993.
- Wang, S.Y. Introductory concepts for photochemistry of nucleic acids. In: Wang, S. Y., eds. *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids*. São Francisco: Academic Press, 1976a, p. 1-21.
- Wang, S.Y. Pyrimidine bimolecular photoproducts. In: Wang, S.Y., eds. *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids*. São Francisco: Academic Press, 1976b, p 295-380.
- Wang, S.Y. Pyrimidine Photodimers. In: Wang, S.Y., eds. *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids*. São Francisco: Academic Press, 1976c, p. 225-293.
- Watson, J.D.; Hopkins, N.H.; Roberts, J.W.; Steitz, J.A.; Weiner, A.M. The mutability and repair of DNA. In: Watson, J.D.; Hopkins, N.H.; Roberts, J.W.; Steitz, J.A.; Weiner, A.M., eds. *Molecular Biology of the Gene*. California, Commings Publishing Company, 1987, p. 339-357.

12. Análise da Expressão Gênica por meio da Técnica de SAGE

(*Serial Analysis of Gene Expression*)

Elida Paula Benquique Ojopi
Emmanuel Dias-Neto

Introdução

A expressão gênica de uma célula representa um dos reflexos funcionais mais importantes de um genoma. Desse modo, a quantificação da expressão de cada um dos transcritos é um dos dados mais relevantes a serem obtidos. A avaliação quantitativa da expressão gênica pode ser feita por algumas técnicas diferentes e, neste capítulo, trataremos da análise da expressão gênica por SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), uma das ferramentas mais precisas e abrangentes atualmente disponíveis. SAGE foi descrita inicialmente em 1995 por Velculescu, Kinzler e Vogelstein, pesquisadores da Universidade de Johns Hopkins, em Baltimore, Maryland, nos Estados Unidos (Velculescu et al., 1995). Desde então, essa técnica mostrou-se uma das ferramentas mais poderosas de avaliação dos genes expressos em grupos celulares de interesse. Basicamente, sequências parciais muito curtas (chamadas de etiquetas ou *tags*), derivadas dos RNAm das amostras biológicas em estudo, são concatenadas, sequenciadas em larga escala, mapeadas nos transcritos e contadas. De modo geral, a frequência de uma etiqueta na população de etiquetas sequenciadas é proporcional à expressão do gene em que essa etiqueta pode ser mapeada.

Desse modo, a técnica de SAGE permite quantificar a expressão dos genes ativos em uma amostra, gerando uma definição detalhada do perfil de expressão gênica em larga escala, na qual a quantificação dos transcritos é representada como uma fração do total e não em relação a outro experimento, ou padrão, ou genes constitutivos, evitando assim vários erros inerentes à normalização entre experimentos. A forma padronizada característica dos experimentos de SAGE possibilita o acúmulo de dados e a comparação entre diferentes bibliotecas, mesmo que produzidas por diferentes grupos de pesquisa.

Um experimento de SAGE típico envolve a comparação entre a frequência de etiquetas derivadas de bi-

bliotecas diferentes, permitindo analisar a significância estatística das diferenças de expressão gênica entre os experimentos para cada transcrito detectado. No entanto, é possível obter dados relevantes com uma única biblioteca em situações experimentais que objetivam a determinação dos genes mais abundantes em uma dada amostra, sem análises comparativas.

De modo geral, a frequência com que a etiqueta de determinado transcrito é observada em uma população de etiquetas produzidas a partir de uma amostra de mRNA (biblioteca de SAGE) é diretamente proporcional à abundância relativa do seu transcrito correspondente na amostra em estudo. A frequência de cada transcrito é armazenada em um banco de dados e utilizada para fazer comparações estatísticas entre as bibliotecas, permitindo identificar marcadores moleculares das amostras avaliadas (revisto em Lal et al., 1999; Madden et al., 2000; Velculescu et al., 2000).

O sequenciamento parcial de clones de bibliotecas de cDNA em larga escala é um método eficiente no acesso a regiões transcritas do genoma humano, permitindo também a identificação de quais transcritos são expressos em cada tecido. Porém, os custos necessários para uma avaliação quantitativa eficiente da expressão gênica utilizando essa abordagem (também conhecida como a geração de ESTs – *expressed sequence tags*) são extremamente altos. A leitura de um clone de uma biblioteca de cDNA gera dados referentes a um único transcrito. Para avaliar 100 mil transcritos utilizando sequenciadores tradicionais, seriam necessárias 100 mil reações de sequenciamento. Em SAGE, devido à concatenação das etiquetas, uma única leitura produz, com facilidade, dados quantitativos referentes a pelo menos 20-30 etiquetas, reduzindo, portanto, o tempo e os custos do sequenciamento em 20-30 vezes. As técnicas baseadas no uso de microarranjos de DNA (*microarrays*) são muito valiosas na determinação de expressão gênica. Porém,

os resultados de expressão limitam-se apenas aos genes que estiverem representados na lâmina ou membrana.

Em comparação com a tecnologia de arranjos de DNA, a técnica de SAGE apresenta algumas vantagens, tais como a determinação dos níveis de expressão diretamente de uma amostra de RNA, sem necessidade de sondas de cDNA, a possibilidade de avaliar todo o transcrito sem a limitação diante do painel de genes que estejam representados nos arranjos, e ainda não há necessidade da infraestrutura necessária para a produção dos arranjos (sala limpa, pressão positiva de ar, sistemas de hibridação, *scanners*, etc.).

Por outro lado, o número de amostras que pode ser processado usando SAGE é pequeno quando comparado aos experimentos com microarranjos de DNA, já que são necessários cerca de 30-40 dias para se produzir uma biblioteca de SAGE e sequenciar um número adequado de etiquetas, utilizando-se um sequenciador de capacidade média de 16 capilares. Contudo, essa limitação pode ser minimizada pela análise de um *pool* de amostras representativas, o que permite a diluição de diferenças individuais que podem não estar relacionadas ao aspecto investigado no estudo. Isso também permite uma grande redução na quantidade de RNA utilizada, deixando espaço para a confirmação individual dos genes selecionados, nas mesmas amostras originais, separadamente.

Principalmente devido a eventos de duplicação gênica, um pequeno percentual das SAGE-etiquetas geradas (5-10%) é ambíguo, isto é, pode ser derivado de transcritos diferentes, dificultando as análises. Além disso, uma fração pequena dos transcritos pode não apresentar sítios de restrição para as enzimas usadas no processo de produção das etiquetas e, desse modo, não pode ser quantificada por esta técnica. Estima-se que essa perda ocorra em menos de 1% dos transcritos humanos (Boon et al., 2002).

Se o objetivo é obter um perfil de expressão qualitativo e quantitativo para um pequeno número de amostras, o trabalho extra que envolve a criação de uma biblioteca de SAGE é certamente justificável.

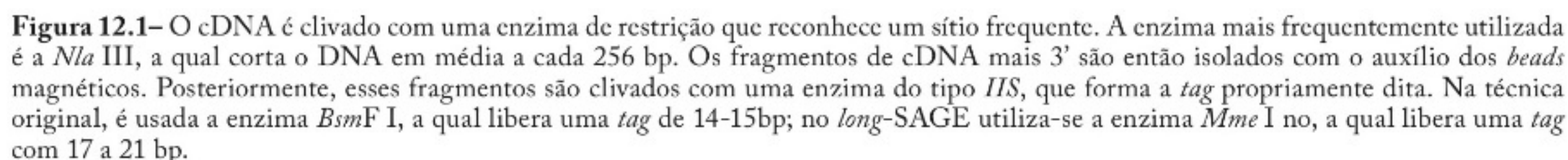
Em geral, a técnica de SAGE tem determinado com sucesso os transcritos diferencialmente expressos em sistemas experimentais bem controlados (He et al., 1998, 1999; Charpentier et al., 2000; Inadera et al., 2000; Wu et al., 2002; Chen et al., 2002; Boon et al., 2002). Saha et al. (2001), utilizando SAGE, identificaram um marcador molecular para tumores de cólon metastáticos com alta sensibilidade e alta especificidade. Este mar-

cador, além de enorme interesse diagnóstico, mostrou também ter grande valor para o desenvolvimento de terapias específicas para essas metástases. Além disso, os dados de SAGE têm sido usados para identificar e quantificar genes novos com grande eficiência.

A Técnica de SAGE

A produção de uma biblioteca de SAGE envolve passos enzimáticos sequenciais. O RNA deve ser isolado das células ou tecido de interesse e imobilizado em esferas magnéticas associadas a um oligo(dT), que possibilita a captura seletiva do RNA poli-A⁺ diretamente da amostra. O cDNA é então sintetizado a partir deste oligo(dT) e clivado com uma enzima de restrição com um sítio frequente (normalmente são usadas enzimas que clivam sítios de 4 bases). A enzima mais frequentemente utilizada é a *Nla* III (5'...CATG↓...3'), a qual corta o DNA em média a cada 256bp (4^e). Os fragmentos de cDNA digeridos pela enzima, ancorados a uma cauda poli-A, são então isolados com o auxílio de esferas magnéticas (Fig. 12.1). Pequenos adaptadores, contendo um sítio para uma enzima do tipo IIS (são enzimas que reconhecem uma sequência de bases e clivam o DNA em uma posição específica até 20 bases após o sítio de reconhecimento) e para a ligação de oligonucleotídeos específicos, são então ligados aos cDNAs isolados pelas esferas. A enzima *Bsm*F I [5'...GGGAC(N)₁₀↓...3'] reconhece o sítio presente no adaptador e libera uma pequena etiqueta. Essas etiquetas são pareadas em *ditags* ou *dietiquetas*, amplificadas por PCR, digeridas com *Nla* III, ligadas para formar concatêmeros e clonadas em um vetor para o sequenciamento simultâneo de todas as etiquetas clonadas. Os procedimentos gerais da técnica de SAGE estão resumidos no quadro 12.1 e na figura 12.2.

A técnica de SAGE está baseada em três princípios: (1) um fragmento curto de oligonucleotídeos (14 bp), denominado *SAGE-Tag*, é suficiente para identificar unicamente um transcrito específico. Isso ocorre por que uma *SAGE-Tag* de 10 bp tem 4¹⁰ combinações potenciais diferentes, levando a uma especificidade de 1:1.048.576 bases (4¹⁰). Se isto é somado às 4 bases do sítio de restrição, teremos uma especificidade de 1:268.435.456, o que é suficiente para determinar de forma não ambígua a maioria dos transcritos de um organismo. No entanto, esta predição é baseada em cálculos estatísticos que assumem uma distribuição aleatória das 4 bases nucleotídicas. Sabemos que esta distribuição não é totalmente aleatória. Existem domínios repetidos em nosso genoma e na prática, e muitos genes independentes ocasionalmente compartilham a mesma *SAGE-Tag*. (2) A concatenação de eti-



Capturar os mRNAs com oligo dT biotinilados acoplados a esferas magnéticas ligados à estreptavidina
Converter o RNA em cDNA
Cortar os cDNAs com uma enzima que reconheça sítios frequentes no genoma e que produza extremidades coesivas
Ligar um “adaptador” a esses finais coesivos que apresente um sítio para oligonucleotídeos e para uma nova enzima que vai cortar a molécula ~10 bases à frente do seu sítio de restrição, formando uma etiqueta
Combinar as etiquetas duas a duas, formando uma unidade, uma dietiqueta (<i>ditag</i>)
Amplificar as dietiquetas por meio de PCR
Remover os adaptadores e unir as dietiquetas, formando os concatâmeros
Clonar os concatâmeros em bactérias
Sequenciar os concatâmeros
Utilizar um <i>software</i> para identificar e contar as etiquetas

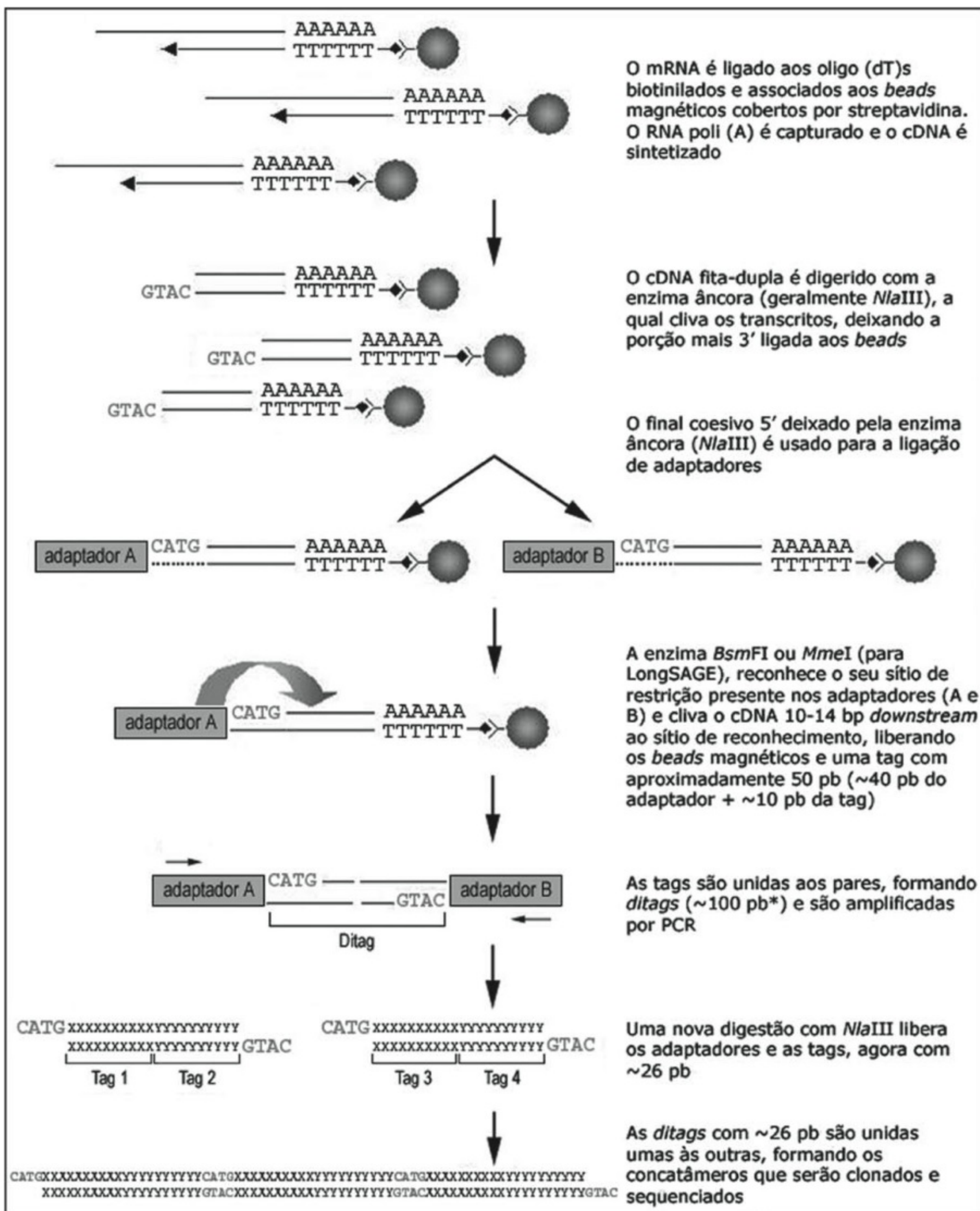


Figura 12.2 – Esquema resumido dos procedimentos realizados durante a construção de uma biblioteca de SAGE (modificado de I-SAGE™ Kit, Invitrogen™).

quetas permite a análise serial dos transcritos aumentando significativamente a eficiência da análise baseada em sequenciamento. Os concatâmeros de etiquetas são subclonados em um vetor e servem como excelentes moldes para o sequenciamento automático. Consequentemente, uma única reação de sequenciamento pode fornecer informação de 20 a 35 genes diferentes. Um experimento de SAGE típico, com a produção de 50.000 etiquetas, requer o sequenciamento de 2.000 clones de concatâmeros, o que tem sido considerado um número de detecção sensível para a maior parte dos genes diferencialmente regulados. Porém, esse número varia de acordo com o tamanho do transcriptoma a ser analisado. (3) O nível de expressão de um dado transcrito é diretamente proporcional ao número de vezes que sua respectiva etiqueta é observada na contagem final.

Com a utilização desta técnica por diversos grupos, os dados de SAGE podem ser utilizados para a construção de bancos de dados cumulativos e, por meio da bioinformática, transcritos como um padrão de expressão particular podem ser identificados e avaliados quanto a sua possível expressão diferencial.

Modificações da Técnica de SAGE Original

Atualmente existem algumas modificações da técnica de SAGE desenvolvidas principalmente para de diminuir a quantidade de RNA necessária para a construção da biblioteca, para aumentar o tamanho dos concatâmeros (ou a quantidade média de etiquetas clonadas por vetor) ou ainda para aumentar o tamanho das etiquetas. O “micro-SAGE”, uma modificação para se aplicar SAGE em situações em que temos quantidades limitadas de material inicial (Datson et al., 1999). Virlon et al. (1999) propuseram uma adaptação capaz de reduzir 1.000 vezes a quantidade de material inicial, capturando o mRNA diretamente dos extratos de túbulos renais microdissecados. Vilain et al. (2003) desenvolveram um método alternativo capaz de gerar bibliotecas de SAGE a partir de 2.500 células (~50 ng de RNA total) por meio da amplificação de pequenos fragmentos de mRNA (<http://www-dsv.cea.fr/thema/get/sade.html>). O mesmo grupo de pesquisadores que desenvolveu a técnica de SAGE criou também o *long-SAGE*, no qual alterava-se a enzima *Bsm* FI por *Mme* I, gerando assim etiquetas maiores, de 21 bp (Saha et al., 2002). Matsumara et al. (2003) utilizaram uma enzima de restrição tipo III (*Eco*P15I) isolando fragmentos de 26 bp e denominaram o procedimento de *Super-SAGE*. Segundo os autores, essa variação da técnica permitiu uma rápida identificação dos genes com expressão alterada.

A escolha do método, contudo, depende dos objetivos esperados com a construção de uma biblioteca de SAGE, e esses devem ser discutidos previamente à aquisição dos reagentes.

SAGE – Procedimento Experimental

O procedimento descrito a seguir é baseado no *kit* I – SAGE™ Kit (T5000-01, T5001-01), registrado e distribuído pela empresa Invitrogen™ Corp. (Carlsbad, CA, EUA), no qual são geradas etiquetas de 14 bp. Apresentamos o protocolo conforme foi utilizado com sucesso por nosso grupo, detalhando os passos mais importantes e indicando alterações que introduzimos no protocolo original (*version* B).

Observações

Os termos 100 bp e 26 bp *ditags* referem ao tamanho da *ditag*, porém, o valor real da *ditag* de 100 bp pode variar de 102 a 106 bp, dependendo do tamanho do adaptador e das *Tags*. Pelo mesmo motivo, o tamanho da *ditag* de 26 bp pode variar de 26 a 30 bp, sendo que a *Bsm*F I cliva em média 14 ou 15 bases (a 65°C) à frente (*downstream*) do seu sítio de restrição. Os “nomes” das *ditags* (100 bp ou 26 bp) são baseados na técnica de SAGE™ original, na qual era utilizada a enzima *Fok* I (que criava uma *tag* de 9 bp), agora substituída pela enzima *Bsm*FI (cria uma *tag* de 14-15 bp) ou pela enzima *Mme* I no *Long-SAGE*, a qual libera uma *tag* com 17 a 21 bp.

Metodologia

Equipamentos e Reagentes Necessários

Estante magnética
Microcentrífuga
Vórtice
Aparato para eletroforese em gel de agarose
Aparato para eletroforese em gel de acrilamida (15×17 cm)
TBE *sample buffer* (tampão de corrida) concentrado 6×
TBE concentrado 1× [Tris-HCl a 90 mM, ácido bórico a 90 mM e EDTA 2 mM (pH 8,0)]
Termociclador
Platinum Taq DNA polimerase
Taq DNA polimerase
Ponteiras para micropipetas com barreiras (para todos os procedimentos)
Etanol 70% e 100%
Fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1)
Água livre de RNase (tratada com inibidor de RNase, por exemplo dietilpirocarbonato – DPEC)

Eletroporador
Fluxo laminar 1
Fluxo laminar 2
Banhos-maria
Centrífuga para tubos de 50 mL
Tubos de 50 mL
Microtubos siliconizados livre de RNase-free de 1,5 mL

Dia 1: Preparando o cDNA (10-12 horas)

A fase individual do processo envolve a ligação do mRNA às esferas magnéticas/síntese de cDNA e ligação dos adaptadores ao cDNA (Quadro 12.5), etapas descritas a seguir.

Reagentes do módulo *cDNA synthesis* (1A) – mantidos a 4°C.

Preparando as esferas-oligo(dT)

1. Ressuspender completa e suavemente os oligos(dT)-esferas (bata no tubo com o dedo – não misture por meio de pipetagem) e transfira 100 µL para um microtubo de 1,5 mL siliconizado livre de RNase.
2. Coloque o microtubo na estante magnética durante 1-2 minutos e cuidadosamente remova e descarte o sobrenadante.
3. Lave as esferas uma vez ressuspendendo-as em 500 µL de tampão de lise e ligação (*lysis/binding buffer*) (item 5. Soluções) como descrito a seguir (se houver um precipitado neste tampão, aqueça-o a 37°C para dissolver o precipitado).

Quadro 12.2 – Lavando as esferas.

- | | |
|----|--|
| A. | Coloque o tubo na estante magnética durante 1-2 minutos. Coloque a ponteira no fundo do tubo cuidadosamente através do lado oposto das esferas. Vagarosamente, remova e descarte o sobrenadante. |
| B. | Adicione o volume apropriado de tampão. |
| C. | Remova o tubo da estante e misture o conteúdo do tubo batendo nele com o dedo. |
| D. | Centrifugue brevemente para coletar todas as esferas. |
| E. | Retorne o tubo para a estante magnética durante 1-2 minutos e remova o sobrenadante. |
| F. | Repita os passos 2-5 até que toda a lavagem esteja completa (o número de lavagens varia e estará descrito em cada item). |
| G. | Após a última lavagem, ressuspenda as esferas no tampão apropriado (item 5. Soluções). |

Ligando o mRNA às esferas magnéticas (*beads*)

4. Prepare a amostra de RNA para ligar as esferas. Ajuste o volume do RNA total (25-50 µg) ou mRNA (50-100 ng) para 1 mL com o tampão de lise e ligação (item 5. Soluções).
5. Coloque o tubo com as esferas lavadas na estante magnética durante 2 minutos e retire o sobrenadante cuidadosamente. Adicione imediatamente toda a mistura RNA + tampão ao tubo com as esferas (as esferas não podem secar).
6. Misture as esferas e a amostra de RNA + tampão por meio de um vórtice lento ou em uma plataforma com agitação intermitente durante 30 minutos em temperatura ambiente.
7. Coloque o tubo na estante magnética durante 2 minutos e retire o sobrenadante cuidadosamente. Aqueça-os em banho-maria a 37°C e 42°C.
8. Lave as esferas 2 vezes com 1 mL de tampão de lavagem A (item 1. Soluções) (conforme descrito no quadro 12.2).
9. Lave as esferas 1 vez com 1 mL de tampão de lavagem B (item 2. Soluções) (conforme descrito no quadro 12.2).
10. Lave as esferas 4 vezes com 100 µL de tampão da primeira fita (*first strand buffer*) concentrado 1×, colocando o tubo na estante magnética durante 1-2 minutos, removendo o sobrenadante entre as lavagens. Na quarta lavagem, **não** remova o sobrenadante.

Sintetizando o cDNA

Linhas gerais – sintetizar o cDNA usando mRNA ligado às esferas magnéticas como molde com a transcriptase reversa (RT) SuperScript II.

- ✓ Reagentes do módulo síntese de *cDNA* (*cDNA synthesis*) (1B) – (mantidos a -20°C).

Síntese da primeira fita de cDNA

11. Antes de remover o sobrenadante, após a 4ª lavagem, prepare a mistura da reação de síntese da primeira fita de cDNA (*first strand cDNA synthesis reaction*) (**no gelo**):

Tampão da primeira fita concentrado 5×	18 µL
RNASEOUT	1 µL
Água ultrapura tratada com DEPC	54,5 µL
0,1 M DTT	9 µL
dNTP <i>mix</i> (10 mM cada)	4,5 µL
Total	87 µL

12. Coloque o tubo na estante magnética durante 1-2 minutos, **remova** o sobrenadante e imediatamente adicione a mistura (87 μ L) da reação de síntese do cDNA.
13. Retire o tubo da estante e misture gentilmente batendo no tubo com o dedo.
14. A seguir, coloque o tubo a 37°C durante 2 minutos para equilibrar os reagentes.
15. Adicione 3 μ L da transcriptase reversa SuperScript II. Misture e incube a 42°C por 1 hora. Misture delicadamente a cada 10 minutos em um vórtice lento. Enquanto isso, equilibre um banho-maria a 16°C e aqueça outro a 75°C.
16. Coloque a reação de primeira fita no gelo e siga para a síntese da segunda fita de cDNA (*second strand cDNA synthesis*).

Síntese da segunda fita de cDNA

17. Adicione os seguintes reagentes para a síntese da segunda fita ao tubo (no gelo) contendo os 90 μ L da reação da primeira fita (adicione a *E. coli* DNA ligação, *E. coli* DNA polimerase e *E. coli* RNase H no final):

Água ultrapura tratada com DEPC	465 μ L
Tampão da segunda fita concentrado 5 \times	150 μ L
dNTP mix (10 mM cada)	15 μ L
<i>E. coli</i> DNA ligação.....	5 μ L
<i>E. coli</i> DNA polimerase.....	20 μ L
<i>E. coli</i> RNase H.....	5 μ L
18. Misture os reagentes por meio de vórtice e centrifugue o tubo brevemente.
19. Incube a reação a 16°C por 2 horas. Ressuspenda as esferas agitando suavemente a cada 10-15 minutos.
20. Coloque o tubo no gelo e adicione 45 μ L de EDTA 0,5M a para parar a reação.
21. Pré-aqueça o tampão de lavagem C (item 3. Soluções) a 75°C.
22. Coloque o tubo na estante magnética durante 1-2 minutos e remova o sobrenadante cuidadosamente. Adicione 750 μ L de tampão de lavagem C (ver item 3. Soluções) aquecido para inativar a *E. coli* DNA polimerase.

Nota: É muito difícil inativar e retirar a E. coli DNA polimerase, especialmente quando a proteína se encontra aderida nas esferas. A atividade exonucleásica desta enzima pode interferir nas reações subsequentes, resul-

tando em digestão incompleta da enzima Nla III após o passo de Scale-up PCR. Recomenda-se a inativação da enzima imediatamente após a síntese de cDNA e após a digestão com enzima Nla III, adicionando tampão de lavagem C (item 3. Soluções) e aquecendo.

23. Misture bem e aqueça a amostra a 75°C durante 10-12 minutos agitando intermitentemente para inativar completamente a polimerase. Coloque o tubo na estante magnética durante 1-2 minutos. Remova o sobrenadante e lave novamente com 750 μ L de tampão de lavagem C (ver item 3. Soluções). Faça os passos de lavagem rapidamente para evitar a precipitação de SDS, o qual pode "capturar" as esferas.
24. Lave 4 vezes com 750 μ L de tampão de lavagem D (item 4. Soluções). Ressuspendidas no tampão D (item 4. Soluções) após a 4ª. lavagem, remova 2-3 μ L da amostra para verificar a síntese do cDNA e armazene a 4°C até que esteja tudo pronto para realizar a PCR. Coloque o tubo na estante magnética durante 1-2 minutos e remova o sobrenadante cuidadosamente.
25. Adicione 200 μ L do tampão de lavagem D (item 4. Soluções) concentrado 1 \times ao tubo e ressuspenda as esferas suavemente. Transfira o conteúdo do tubo para um novo tubo de 1,5 mL para evitar qualquer traço de atividade exonucleásica da *E. coli* DNA polimerase. Se as esferas ficarem aderidas nas paredes do tubo, retire-as gentilmente usando uma ponteira. Lave o tubo antigo com 200 μ L do mesmo tampão e transfira o conteúdo para o novo tubo contendo o restante da reação.
26. Coloque o tubo na estante magnética durante 1-2 minutos.
27. Remova o sobrenadante e descarte-o. Adicione 200 μ L do tampão de lavagem D concentrado 1 \times (item 4. Soluções).

Obs.: Mantenha as esferas no tampão de lavagem (item 4. Soluções) a 4°C até que se tenha o resultado da PCR (Quadro 12.3) e possa prosseguir para a digestão com Nla III. As esferas podem permanecer neste tampão overnight.

Digerindo o cDNA com Nla III

Linhas gerais – uma vez que a síntese do cDNA esteja completa e sua integridade verificada, clive o cDNA com a enzima âncora, *Nla III*.

- ✓ reagentes do módulo *clivagem* — mantidos a -20°C;
- ✓ reagentes do módulo *Nla III* — mantidos a -80°C;
- ✓ estabilize um banho-maria a 37°C.

28. Coloque o tubo na estante magnética durante 1-2 minutos e **remova** o sobrenadante.
29. Ressuspenda as esferas na seguinte reação:
- | | |
|---|-------|
| LoTE (item 6. Soluções)..... | 172µL |
| BSA concentrado 100× | 2µL |
| Tampão D (item 4. Soluções) Concentrado 10× . | 20µL |
| <i>Nla</i> III | 6µL |
| Total | 200µL |
30. Incube a 37°C durante 3 horas. Agite ocasionalmente batendo no tubo com o dedo.
31. Coloque o tubo contendo o tampão de lavagem C (item 3. Soluções) em banho-maria 37°C para prevenir a precipitação do SDS.
32. Quando a reação estiver completa, coloque o tubo na estante magnética durante 1-2 minutos e retire o sobrenadante cuidadosamente. Inative a *Nla* III lavando o tubo 3 vezes com 750 µL de tampão de lavagem C aquecido (item 3. Soluções).
33. Lave as esferas 4 vezes com 750 µL de tampão de lavagem D (item 4. Soluções). Após a última lavagem, ressuspenda as esferas em 750 µL de tampão de lavagem D (item 4. Soluções). Reserve 2-3 µL da amostra para PCR a fim de determinar a eficiência da digestão da *Nla* III e mantenha a amostra a 4°C até que se esteja pronto para realizar a PCR (Quadro 12.4).
34. Coloque o tubo na estante magnética durante 1-2 minutos e retire o sobrenadante cuidadosamente.
35. Lave as esferas 2 vezes com 150 µL de tampão de ligação concentrado 1× (*ligase buffer*). Após a lavagem final, ressuspenda as esferas em 100 µL do mesmo tampão e divida a amostra igualmente em 2 tubos novos (A e B).
36. Lave os tubos A e B contendo os *beads* mais uma vez com tampão de ligação concentrado 1× (*ligase*).

Quadro 12.3 – Verificando a síntese de cDNA (pode-se fazer no dia 2).

A PCR pode ser feita para verificar a síntese de cDNA quando estiver utilizando amostras de RNA humano. Se estiver usando RNA de outras fontes, utilize um *set* de oligonucleotídeos apropriado. Se não houver tempo suficiente para completar a PCR, pode-se fazer no dia 2 ou dia 3. Analisar 10 µL da reação usando eletroforese em gel de agarose.

Reagentes	GAPDH	EF
Tampão BV concentrado 10×	2,5 µL	2,5 µL
DMSO	1,5 µL	1,5 µL
dNTP <i>mix</i> (10mM cada)	2,5 µL	2,5 µL
GAPDH <i>primer set</i>	2 µL	–
EF <i>primer sense</i>	–	1 µL
EF <i>primer antisense</i>	–	1 µL
<i>Taq</i> DNA polimerase	0,5 µL	0,5 µL
Água ultrapura tratada com DEPC	16 µL	16 µL
Amostra (item 24)	0,5 µL	0,5 µL

Ciclos de PCR

95°C – 2 minutos

95°C – 1 minuto; 55°C – 1 minuto; 72°C – 2 minutos (30 ciclos)

72°C – 5 minutos

4°C ∞

Resultados esperados: após a eletroforese em gel de agarose, deve-se observar uma banda de 540 bp, amplificada pelos oligonucleotídeos de GAPDH, e uma banda de 350 bp, amplificada pelos oligonucleotídeos (EF *primer sense* e EF *antisense primer*). Após a digestão com *Nla* III, os sítios para a os oligonucleotídeos de GAPDH são perdidos e não há amplificação, enquanto os sítios dos oligonucleotídeos de EF continuam intactos.

Ressuspenda as esferas em tampão ligação concentrado 1× (*ligase*) e proceda imediatamente à reação de ligação (*ligase*) dos adaptadores (*ligating adapters to the cDNA*) (Quadro 12.5).

Ligando os adaptadores ao cDNA

Linhas gerais – após digerir o cDNA com *Nla* III, ligue os adaptadores de 40 bp com um sítio de restrição para a enzima tipo IIS, *Bsm*F I.

- ✓ reagentes do módulo *clivagem* – mantidos a -20°C ;
- ✓ estabilize em banho-maria a 16°C ;
- ✓ aqueça em banho-maria a 50°C .

37. Coloque o tubo na estante magnética durante 1-2 minutos e **retire** o sobrenadante cuidadosamente.

38. Adicione os seguintes reagentes às esferas (no gelo):

Reagente	Tubo A	Tubo B
cDNA ligado às esferas	esferas	esferas
Adaptador A (20 ng/ μL)	1,5 μL	–
Adaptador B (20 ng/ μL)	–	1,5 μL
LoTE (item 6. Soluções)	14,0 μL	14,0 μL
Tampão de <i>ligase</i> concentrado 10×	2,0 μL	2,0 μL
Total	17,5 μL	17,5 μL

39. Ressuspenda as esferas batendo no tubo com o dedo. Aqueça os tubos por 2 minutos a 50°C .

40. Esfrie os tubos em temperatura ambiente durante 15 minutos e resfrie as amostras no gelo.

41. Adicione 2,5 μL de T4 DNA *ligase* e misture bem.

42. Incube por 2 horas a 16°C . Misture a cada 10-15 minutos batendo no tubo com um dedo.

Quadro 12.4 – Verificando a digestão com *Nla* III (pode-se fazer no dia 2).

A PCR pode ser feita para verificar a eficiência da digestão com *Nla* III quando estiver utilizando amostras de RNA humano. Se estiver usando RNA de outras fontes, utilize um conjunto de oligonucleotídeos apropriado. Se não houver tempo suficiente para completar a PCR, pode-se fazer no dia 2 ou dia 3. Analisar 10 μL da reação usando eletroforese em gel de agarose.

Reagentes	GAPDH	EF
Tampão BV Concentrado 10× BV	2,5 μL	2,5 μL
DMSO	1,5 μL	1,5 μL
dNTP <i>mix</i> (10 mM cada)	2,5 μL	2,5 μL
GAPDH <i>primer set</i>	2 μL	–
EF <i>primer sense</i>	–	1 μL
EF <i>primer antisense</i>	–	1 μL
Taq DNA polimerase	0,5 μL	0,5 μL
Água ultrapura tratada com DEPC	16 μL	16 μL
Amostra (do item 33 acima)	0,5 μL	0,5 μL

Ciclos da PCR

95°C –2 minutos

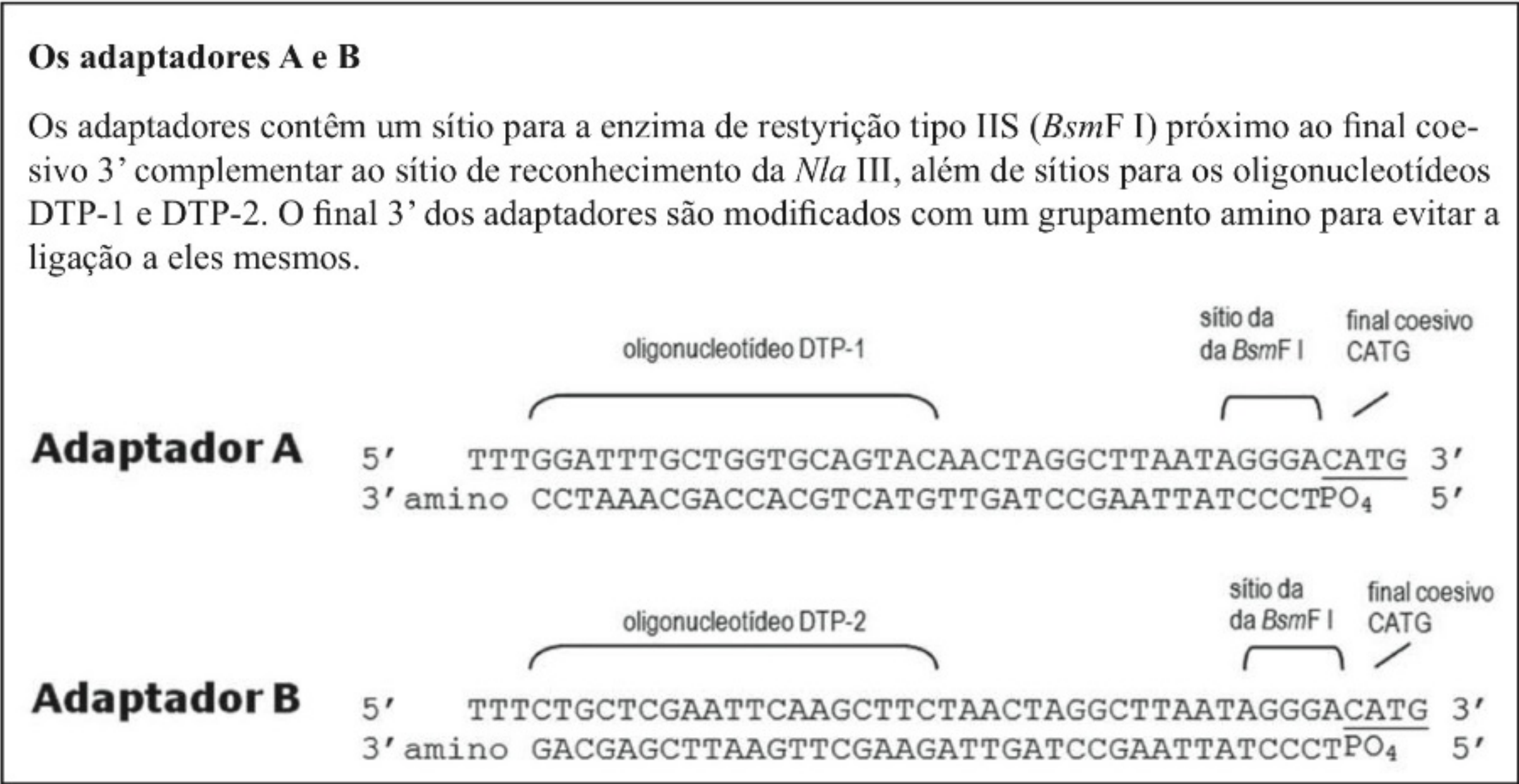
95°C –1 minuto; 55°C –1 minuto; 72°C –2 minutos (30 ciclos)

72°C –5 minutos

4°C ∞

Resultados esperados: a digestão eficiente com *Nla* III resulta na perda dos sítios para os oligonucleotídeos de GAPDH e não há amplificação, enquanto os sítios dos oligonucleotídeos de EF continuam intactos.

Quadro 12.5 – Ligação dos adaptadores ao cDNA.



Quadro 12.6 – Verificando a ligação dos adaptadores (pode-se fazer no dia 2).

A PCR pode ser feita para verificar a eficiência da ligação dos adaptadores quando estiver utilizando amostras de RNA humano. Se estiver usando RNA de outras fontes, utilize um conjunto de oligonucleotídeos apropriado. Se não houver tempo suficiente para completar a PCR, pode-se fazer no dia 2 ou dia 3. Analisar 10 µL da reação usando eletroforese em gel de agarose.

Reagentes	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
Tampão BV concentrado 10×	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL
DMSO	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL
dNTP <i>mix</i> (10 mM cada)	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL
DTP-1	1,0 µL	1,0 µL	–	–
DTP-2	–	–	1,0 µL	1,0 µL
EF <i>primer antisense</i>	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL
<i>Taq</i> DNA polimerase	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
Água ultrapura tratada com DEPC	16,0 µL	16,0 µL	16,0 µL	16,0 µL
Amostra do tubo A (item 43 acima)	0,5 µL	–	0,5 µL	–
Amostra do tubo B (item 43 acima)	–	0,5 µL	–	0,5 µL

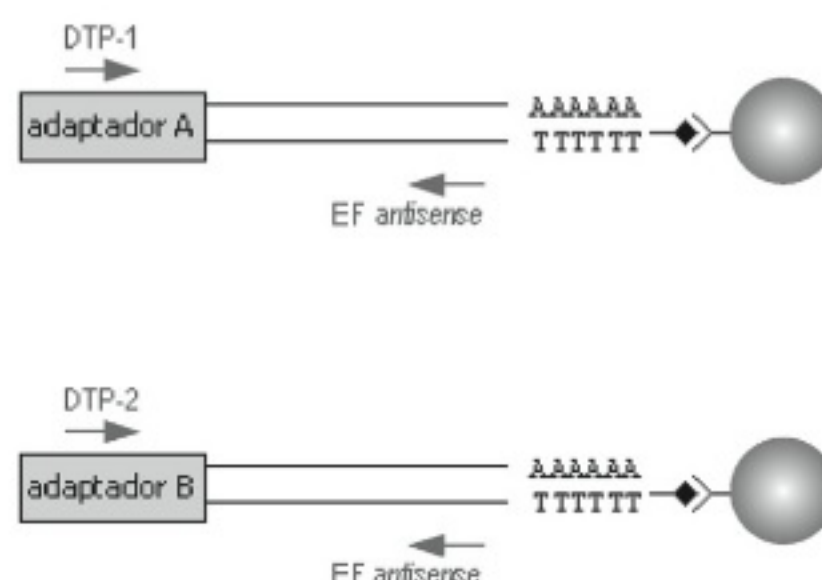
Ciclos da PCR

95°C – 2 minutos

95°C – 1 minuto; 55°C – 1 minuto; 72°C – 2 minutos (25-30 ciclos)

72°C – 5 minutos

4°C ∞



Resultados esperados: após a ligação (passo 43), uma alíquota é removida para se verificar a eficiência da reação. Utilizando-se os oligonucleotídeos DTP-1, DTP-2 e EF *antisense* na PCR, uma reação de ligação dos adaptadores bem-sucedida vai produzir uma banda de 350 bp com a dupla de oligonucleotídeos apropriada (para o adaptador A: DTP-1 + EF *antisense*; para o adaptador B: DTP-2 + EF *antisense*).

- Incube a 65°C durante 1 hora misturando os reagentes (batendo no tubo com um dedo) ocasionalmente.
- Coloque os tubos na estante magnética durante 1-2 minutos e retire o sobrenadante cuidadosamente e transfira-os para dois microtubos novos. **Não** des-

carte o sobrenadante. As *etiquetas* estão presentes no sobrenadante após a digestão com *BsmF* I.

- Ressuspender as esferas em 500 µL de tampão de lavagem D (item 4. Soluções) para PCR (Quadro 12.7). Se não houver tempo para realizar a PCR, as esferas podem ser estocadas a 4°C.

Quadro 12.7 – Verificando a digestão com BsmF I.

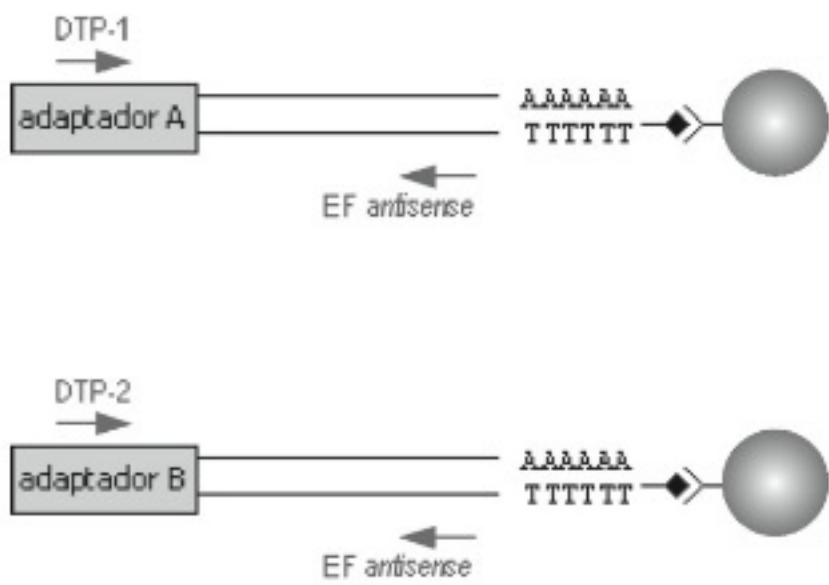
A PCR pode ser feita para verificar a eficiência da digestão com *BsmF* I quando estiver utilizando amostras de RNA humano. Se estiver usando RNA de outras fontes, utilize um conjunto de oligonucleotídeos apropriado. Após a digestão com *BsmF* I, as *etiquetas* estarão presentes no sobrenadante e a amplificação da amostra (esferas) com os oligonucleotídeos DTP-1 ou DTP-2 e EF *antisense* não deve produzir nenhuma banda, já que os sítios de ligação dos oligonucleotídeos são perdidos após a clivagem. Este passo de PCR pode não detectar problemas sutis na digestão com *BsmF* I. Se você não fez as reações de PCR anteriores, elas podem ser feitas agora (*verificando a síntese de cDNA, a digestão com Nla III, a ligação dos adaptadores e a digestão com BsmF I*). Analisar 10 µL da reação usando eletroforese em gel de agarose.

Lave as esferas do passo 7 com 500 µL de tampão de lavagem D (ver item soluções) antes da PCR.

Reagentes	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
Tampão BV concentrada 10×	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL
DMSO	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL
dNTP <i>mix</i> (10 mM cada)	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL
DTP-1 ou DTP-2	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL
EF <i>primer antisense</i>	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL
<i>Taq</i> DNA polimerase	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
Água ultrapura tratada com DEPC	16,0 µL	16,0 µL	16,0 µL	16,0 µL
Amostra do tubo A (item 7 acima)	–	–	0,5 µL	–
Amostra do tubo B (item 7 acima)	–	–	–	0,5 µL
Amostra do tubo A (item 43 acima)	0,5 µL	–	–	–
Amostra do tubo B (item 43 acima)	–	0,5 µL	–	–

Ciclos da PCR

- 95°C – 2 minutos
- 95°C – 1 minuto; 55°C – 1 minuto; 72°C – 2 minutos (25 ciclos)
- 72°C – 5 minutos
- 4°C ∞



Resultados esperados: Não deve ser obtida nenhuma amplificação.

Precipitação com etanol

8. Adicione o mesmo volume de fenol/clorofórmio a cada sobrenadante do item 6.
9. Misture bem e centrifugue na velocidade máxima durante 5 minutos em temperatura ambiente.
10. Transfira a fase aquosa (superior) (200 µL) para um tubo de microcentrífuga novo.
11. Adicione 133 µL de acetato de amônio a 7,5 M, 3 µL de glicogênio de mexilhão (*mussel glycogen*) e 1.000 µL de etanol 100%. Misture vigorosamente.
12. Coloque no gelo seco durante 10 minutos e centrifugue na velocidade máxima durante 30-40 minutos a 4°C.
13. Remova o sobrenadante cuidadosamente e descarte-o (sem tocar no precipitado).
14. Lave o precipitado 2 vezes com 500-1000 µL de etanol 70%.
15. Após a lavagem final, centrifugue novamente para coletar qualquer resíduo mínimo de etanol.
16. Remova o resíduo de etanol cuidadosamente com uma pipeta e deixe o precipitado secar durante 5-10 minutos.
17. Ressuspenda cada precipitado em 10 µL de LoTE (item 6. Soluções) e incube a 37°C durante 3 minutos (para ajudar na solubilização). Proceda à reação da enzima *Klenow* (*klenow reaction*) imediatamente.

Ligando as etiquetas para criar as ditags

Linhas gerais – após a digestão com *BsmF I*, as *etiquetas* são submetidas a uma reação da enzima *Klenow* para completar o final 5'. As *etiquetas* são então ligadas para formar as 100 bp *ditags*.

Reação *Klenow*

- ✓ banho-maria a 37°C e 16°C;
 - ✓ gelo seco;
 - ✓ etanol 100% e 70% (gelado);
 - ✓ óleo mineral;
 - ✓ reagentes do módulo formação de dietiquetas – (mantidos a – 20°C).
18. Adicione os seguintes reagentes aos tubos A e B contendo 10 µL de amostra:

Tampão <i>Klenow</i> concentrado 10×5,0 µL
BSA concentrado 100×1,0 µL

dNTP <i>mix</i> (10mM cada).....	2,5 µL
Água ultrapura tratada com DEPC	30,5 µL
<i>Klenow</i> polimerase.....	1,0 µL
Total	50,0 µL

19. Misture bem e incube a 37°C durante 30 minutos.
20. Faça um *pool* das *ditags* transferindo os 50 µL do tubo A para o tubo B (100 µL do total). Lave o tubo A com 200 µL de LoTE (item 6. Soluções) e transfira para o tubo B, aumentando o total para 300 µL.

Precipitação com etanol

21. Adicione o mesmo volume de fenol/clorofórmio (300 µL) ao sobrenadante do item 20.
22. Misture bem e centrifugue na velocidade máxima durante 5 minutos em temperatura ambiente.
23. Transfira a fase aquosa (superior) (300 µL) para um tubo de microcentrífuga novo.
24. Remova 100 µL da fase aquosa do item anterior para outro tubo que será usado como controle negativo (sem *ligase*). Adicione 100 µL de água ultrapura tratada com DEPC ao controle negativo para atingir um volume final de 200 µL.

Obs.: se estiver construindo duas bibliotecas de SAGE, podem-se misturar os dois controles negativos, a fim de atingir um volume igual a 200 µL.

25. Adicione 133 µL de de acetato de amônio a 7,5M, 3 µL glicogênio e 1.000 µL de etanol 100% aos 200 µL da amostra e do controle negativo. Misture.
26. Coloque no gelo seco durante 10-20 minutos e centrifugue na velocidade máxima durante 30-40 minutos a 4°C.
27. Remova o sobrenadante cuidadosamente e descarte-o (sem tocar no precipitado).
28. Lave o precipitado 2 vezes com 500-1000 µL de etanol 70% gelado.
29. Após a lavagem final, centrifugue novamente para coletar qualquer resíduo mínimo de etanol.
30. Remova o resíduo de etanol cuidadosamente com uma pipeta e deixe o precipitado secar durante 5-10 minutos.
31. Ressuspenda o precipitado em 1,5 µL de LoTE (item 6. Soluções) e incube a 37°C durante 3 minutos (para ajudar na solubilização). Proceda a formação de *ditags* imediatamente.

Formando as Ditags

32. Prepare a seguinte mistura de reação em dois tubos estéreis (no gelo):

	2× ditag reação mix	2× negativo controle
Tris-HCl 3mM, pH 7.5	1,25 µL	2,25 µL
tampão <i>ligase</i> concentrado 10×	0,75 µL	0,75 µL
Água ultrapura tratada com DEPC	0,75 µL	0,75 µL
T4 DNA <i>Ligase</i>	1,50 µL	–

33. Adicione 1,5 µL de mistura concentrada 2× para a reação de dietiquetas às etiquetas ressuspendidas em 1,5 µL de LoTE (item 6. Soluções). Adicione 1,5 µL da mistura de controle negativo 2× ao controle negativo.

34. Incube a 16°C *overnight* (12–16 horas).
(No dia seguinte)

35. Após a incubação, adicione 14 µL de LoTE (item 6. Soluções) a cada mistura de reação no *locação 2*. Prossiga para a amplificação das ditags.

Locação 1: preferencialmente em um fluxo laminar ou outro local no qual os reagentes pré-PCR serão misturados e os controles negativos serão preparados.

Locação 2: preferencialmente em um segundo fluxo laminar no qual as amostras de ditags diluídas serão adicionadas às reações de PCR.

Dias 3-4: Amplificando as Ditags**Executando a PCR**

Linhas gerais – otimiza a amplificação dos *ditags* usando diferentes diluições do produto ligado (amostra) e os oligonucleotídeos fornecidos no *kit* (DTP-1 e DTP-2). Uma vez determinada a diluição ótima da amostra, realiza-se uma *scale-up* PCR para gerar uma quantidade suficiente de *ditags* para formar os concatêmeros.

- ✓ *platinum Taq* DNA polimerase;
- ✓ placas de 96 orifícios para PCR;
- ✓ gelo;
- ✓ gel de poliacrilamida a 10–20% ou agarose a 4% (2 géis);

- ✓ óleo mineral (caso seu termociclador evapore);
- ✓ tampão de corrida concentrada 6× e TBE;
- ✓ reagentes do módulo *ditags* PCR – mantidos a –20°C.

Otimizando a PCR das ditags

1. Dilua as amostras com água estéril, conforme descrito abaixo:
 - ✓ controle negativo (sem ligação) do passo 35 acima → 1/20 na *locação 1*;
 - ✓ amostras do passo 35 acima → 1/20, 1/40 e 1/80 na *Locação 2*.
2. Prepare a mistura da reação de PCR para 6 tubos (no gelo, *locação 1* Quadro 12.8):

Scale-up PCR

3. Prepare a mistura da reação de PCR (no gelo, *locação 1*); o número de reações vai depender da diluição determinada a partir da otimização realizada acima.

Reagentes para 1 reação

Tampão BV concentrado 10×	5,0 µL
DMSO	3,0 µL
dNTP <i>mix</i> (10 mM cada)	7,5 µL
DTP-1	2,0 µL
DTP-2	2,0 µL
Água ultrapura tratada com DEPC	24,0 µL
<i>Platinum Taq</i> DNA polimerase	0,5 µL
Total	44,0 µL

4. Adicione 44 µL desta reação às placas de 96 orifícios na *locação 1*. Adicione 6 µL de água ultrapura estéril a um poço controle negativo.
5. Na *locação 2*, dilua as amostras apropriadamente e adicione 6 µL da amostra diluída a cada um dos poços contendo a mistura da reação de PCR.

Obs.: se for observado um produto de 100 bp forte com 1 µL da diluição de 1:20 da amostra, pode-se diluir toda a amostra (14 µL) 1:120 e usar 6 µL desta diluição em cada reação de PCR (280 reações).

6. Utilize os parâmetros de ciclagem e a análise pós-PCR conforme descrito para a otimização da PCR de *ditags*. Após a análise do produto de PCR, prossiga para o gel de purificação das 100 bp *ditags*.

Quadro 12.8 – Locação 1.

Tubos 1-3: diferentes diluições da amostra

Tubo 4: I-SAGE™ amostra-controle

Tubo 5: controle negativo (sem amostra)

Tubo 6: controle negativo (sem ligação)

*adicione as amostras apenas na *locação 2*.

Reagentes	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
Tampão BV concentrado 10×	5,0 µL	5,0 µL	5,0 µL	5,0 µL	5,0 µL	5,0 µL
DMSO	3,0 µL	3,0 µL	3,0 µL	3,0 µL	3,0 µL	3,0 µL
dNTP mix (10mM cada)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
DTP-1	2,0 µL	2,0 µL	2,0 µL	2,0 µL	2,0 µL	2,0 µL
DTP-2	2,0 µL	2,0 µL	2,0 µL	2,0 µL	2,0 µL	2,0 µL
Água ultrapura tratada com DEPC	29,0 µL	29,0 µL	29,0 µL	29,0 µL	29,0 µL	29,0 µL
Platinum Taq DNA polimerase	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
Amostra diluída 1/20	1,0 µL	–	–	–	–	–
Amostra diluída 1/40	–	1,0 µL	–	–	–	–
Amostra diluída 1/80	–	–	1,0 µL	–	–	–
I-SAGE™ amostra-controle	–	–	–	1,0 µL	–	–
Controle negativo diluído 1/20	–	–	–	–	–	1,0 µL

Ciclo da PCR

95°C - 2 minutos

95°C - 30 segundos; 55°C - 1 minuto; 70°C - 1 minuto (27 ciclos)

70°C - 5 minutos

4°C ∞

Após a PCR, aplique 10% dos produtos em um gel de agarose a 4% na seguinte ordem: controle negativo (sem amostra), controle negativo (*sem ligase*), marcador de peso molecular de 100 bp, marcador de peso molecular de 20 bp, amostra diluída 1/20, amostra diluída 1/40, amostra diluída 1/80, I-SAGE™ amostra-controle.

Dia 5: Isolando as *Ditags* 100 bp (10 horas)

Gel para purificação das *ditags* 100 bp

Linhas gerais – purificação das *ditags* de 100 bp após a *scale-up* PCR. A reação de PCR é submetida a uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% para separar as *ditags* de 100 bp das *ditags* de 80 bp contaminante. As *ditags* de 100 bp são cortadas, eluídas do gel e purificadas utilizando colunas.

- ✓ tubos cônicos estéreis de 50 mL;
- ✓ microtubos estéreis de 0,5 e 1,5 mL;
- ✓ agulhas;
- ✓ gelo seco;
- ✓ fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1);

- ✓ etanol a 100%;
- ✓ etanol a 70% gelado;
- ✓ gel de poliacrilamida a 12% (15 × 17 cm; pente 1,5 mm);
- ✓ tampão Trisborato/EDTA(TBE);
- ✓ TBE;
- ✓ tampão de corrida concentrada 6×
- ✓ marcador de peso molecular (100 e 50 bp);
- ✓ lâminas novas;
- ✓ solução de brometo de etídio 0,5-2 µg/mL ou SYBR Green;
- ✓ banho-maria 65°C;
- ✓ reagentes do módulo *Concatemer* – mantidos a -20°C.

1. Faça um *pool* com todos os produtos de PCR das placas de 96 poços em um tubo cônico estéril de 50 mL.
2. Adicione um volume igual de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico ao tubo. Centrifugue a $2.400 \times g$ durante 15 minutos em temperatura ambiente e transfira a fase aquosa (superior) para outro tubo cônico estéril de 50 mL.
3. Para ~12,5 mL de amostra, adicione 3,2 mL de acetato de amônio, a 7,5M, 72 μ L de glicogênio e 22,8 mL de etanol a 100%. Misture vigorosamente.
4. Coloque o tubo no gelo seco durante 20 minutos e centrifugue a $12.000 \times g$ durante 40 minutos a 4°C.
5. Remova o sobrenadante cuidadosamente e descarte-o. Lave o precipitado 3 vezes com 25 mL de etanol a 70% gelado.
6. Remova cuidadosamente o etanol e deixe o precipitado secar durante 20 minutos.
7. Ressuspenda o precipitado em 300 μ L de LoTE (item 6. Soluções) e incube a 37°C durante 10 minutos para auxiliar na solubilização.
8. Adicione 60 μ L de do tampão de corrida concentrado 6 \times (item 7. Soluções) e aplique ~40 μ L por canaleta (9 canaletas) em um gel de poliacrilamida.
9. Corra a eletroforese até que o corante azul de bromofenol saia fora do gel e o xileno cianol alcance 1-2 cm do fim do gel.
10. Após a eletroforese, core o gel em uma solução de brometo de etídio 0,5-2 μ g/mL ou SYBR *Green* e visualize as bandas sob luz ultravioleta. Deve-se observar uma banda de 100 bp intensa e uma de 80 bp fraca.

Eluindo o DNA do gel

11. Faça um furo no fundo de um microtubo de 0,5 mL estéril usando uma agulha de calibre 18. São necessários 2 tubos por canaleta.
12. Recorte as bandas de 100 bp do gel usando uma lâmina nova. Corte cada banda do gel em dois pedaços e coloque cada um em um microtubo de 0,5 mL com furo. Repita este passo até que todas as bandas das outras canaletas tenham sido retiradas.
13. Coloque cada microtubo em um tubo de 1,5 mL estéril e centrifugue na velocidade máxima de uma centrífuga durante 2-3 minutos (tenha cuidado para não arrancar as tampas dos tubos). As bandas recortadas serão quebradas em pequenos pedaços e coletadas nos tubos de 1,5 mL.

14. Descarte os tubos de 0,5 mL.
15. Prepare 150 μ L de LoTE (item 6. Soluções) a 7,5M acetato de amônio (125:25) e adicione esta mistura ao tubo de 1,5 mL contendo os pedaços de gel. Certifique-se de que todos os pedaços de gel estão cobertos com o tampão. Misture bem através de vórtice.
16. Incube a 65°C por 2 horas para eluir o DNA do gel. Pode-se incubar a 4°C *overnight* (16 horas) seguido por 65°C durante 15 minutos, se não houver tempo suficiente para completar a eluição.
17. Transfira o conteúdo do tubo para uma coluna SNAP™ acoplada a um tubo coletor. Centrifugue na velocidade máxima em uma microcentrífuga durante 2 minutos.
18. Recolha o eluído (~150 μ L) e junte o eluído de 2 tubos coletores em um novo microtubo de 1,5 mL, recuperando um total de 300 μ L.

Precipitação com etanol

19. Para 300 μ L de eluído, adicione 133 μ L de de acetato de amônio a 7,5 M, 3 μ L de glicogênio e 1.000 μ L de etanol 100%. Misture vigorosamente.
20. Coloque no gelo seco durante 20 minutos e centrifugue na velocidade máxima durante 30 minutos a 4°C.
21. Remova o sobrenadante cuidadosamente e descarte-o. (sem tocar no precipitado).
22. Lave o precipitado 2 vezes com 500 μ L de etanol 70%.
23. Remova o resíduo de etanol cuidadosamente com uma pipeta e deixe o precipitado secar durante 5-10 minutos.
24. Ressuspenda cada precipitado em 14 μ L de LoTE (item 6. Soluções) e então junte todas as amostras (126 μ L).
25. Armazene as 100 bp de *ditag* a -20°C *overnight* (16 horas) ou proceda a digestão com *Nla* III (*Nla* III *clivagem*).

Dia 6: Isolando as *Dietiquetas* 26 bp

1. Digestão das ditags 100 bp com Nla III

Linhas gerais: a digestão das 100 bp *ditag* com *Nla* III produz *ditags* de 26 bp. É importante que se obtenha > 80% de eficiência na digestão com *Nla* III para obter uma boa produção de 26 bp *ditags*.

- ✓ gelo seco;

- ✓ etanol 100%;
- ✓ etanol 70% gelado;
- ✓ banho-maria a 37°C;
- ✓ reagentes dos módulos *Nla* III e *Concatemer*.

Clivagem com *Nla* III

1. Faça 3 alíquotas iguais dos produtos de 100 bp. Adicione os seguintes reagentes a cada um dos 3 tubos:

<i>Ditag</i> de 100 bp	42 µL
Tampão D (item 4. Soluções) concentrado 10×	15 µL
BSA concentrado 100×	2 µL
<i>Nla</i> III	12 µL
Água ultrapura tratada com DEPC	79 µL
Total	150 µL
2. Misture todos os reagentes e incube a 37°C *overnight*.
Obs.: pode-se fazer a digestão durante 3 horas, porém, geralmente, não é suficiente.
3. Acrescente 50 µL de LoTE (item 6. Soluções).
4. Retirar 5 µL da reação e verificar em um gel de agarose para verificar a eficiência.
5. Deve-se obter > 80% de 100 bp *ditags* com fragmentos de clivadas para ter um bom rendimento 26 bp de *ditags*. Se for observada uma grande quantidade de 100 bp de *ditags*, deve-se fazer uma digestão com *Nla* III *overnight* (16 horas) após a precipitação da reação de com *Nla* III etanol.
6. Se a digestão com *Nla* III for eficiente, siga para a precipitação com etanol.

Precipitação com etanol

7. Acrescente o mesmo volume de fenol/clorofórmio em cada tubo, misture e centrifugue na velocidade máxima em uma microcentrífuga durante 5 minutos em temperatura ambiente.
8. Transfira (200 µL) da fase aquosa (superior) para um novo tubo e adicione 90 µL de acetato de amônio a 7,5 M, 3 µL de glicogênio e 850 µL de etanol 100 %. Misture bem.
9. Coloque no gelo seco durante 20 minutos e centrifugue na velocidade máxima em uma microcentrífuga durante 30 minutos a 4°C.
10. Remova o sobrenadante cuidadosamente e descarte-o (sem tocar no precipitado).

11. Lave o precipitado 2 vezes com 1.000 µL de etanol 70% gelado.
12. Remova o resíduo de etanol cuidadosamente e deixe o precipitado secar durante 5-10 minutos.
13. Ressuspense cada precipitado em 10 µL de LoTE (item 6. Soluções) e então junte todas as amostras.
14. Combine os precipitados em um tubo e ajuste o volume para 32 µL usando LoTE (item 6. Soluções). Certifique-se de que os precipitados estejam completamente dissolvidos e então prossiga para o gel de purificação das *ditags* com fragmentos 26 bp.

Gel para purificação das *ditags* 26 bp

- ✓ banhos-maria a 37°C e 65°C;
 - ✓ microtubos estéreis de 0,5 mL e 1,5mL;
 - ✓ agulha de calibre 18;
 - ✓ gelo seco;
 - ✓ etanol a 100%;
 - ✓ etanol a 70% gelado;
 - ✓ gel de poliacrilamida a 12% (15 × 17 cm; pente 1,5mm);
 - ✓ tampão Tris borato/EDTA (TBE);
 - ✓ tampão de corrida concentrado 6×;
 - ✓ marcador de peso molecular 20 bp;
 - ✓ lâminas novas;
 - ✓ solução de brometo de etídio 0,5-2 µg/mL ou *SYBR Green*;
 - ✓ reagentes do módulo *Concatâmero* – mantidos a –20°C.
15. Adicione 7 µL de tampão de corrida concentrado 6× à amostra do item 14. Aplique 13 µL da amostra por canaleta de um gel de poliacrilamida a 12%.
 16. Corra a eletroforese até que o corante azul de bromofenol alcance 2-3 cm do fim do gel.
 17. Após a eletroforese, core o gel em uma solução de brometo de etídio 0,5-2 µg/mL ou *SYBR Green* e visualize as bandas sob luz ultravioleta.
 18. Deve-se observar uma banda de 26 bp, uma de 40 bp (adaptadores) e de 60-100 bp (resultantes da digestão incompleta da *Nla* III).

Eluindo o DNA do gel

19. Faça um furo no fundo de um microtubo de 0,5 mL estéril usando uma agulha de 18 G. São necessários 2 tubos por canaleta.
20. Recorte as bandas de 26 bp do gel usando uma lâmina nova. Corte cada banda do gel em dois pedaços e coloque cada pedaço em um microtubo de 0,5 mL com furo. Repita este passo até que todas as bandas das outras canaletas tenham sido retiradas.
21. Coloque cada microtubo em um tubo de 1,5 mL estéril e centrifugue na velocidade máxima de uma centrífuga durante 2-3 minutos (tenha cuidado para não arrancar as tampas dos tubos). As bandas recortadas serão quebradas em pequenos pedaços e coletadas nos tubos de 1,5 mL.
22. Descarte os tubos de 0,5 mL.
23. Prepare 150 µL de LoTE (item 6. Soluções) acetato de amônio 7,5M (125:25) e adicione esta mistura ao tubo de 1,5 mL contendo os pedaços de gel. Certifique-se de que todos os pedaços de gel estão cobertos com o tampão. Misture bem por meio de vórtice.
24. Incube a 65°C durante 2 minutos.
25. Incube a 37°C durante 2 horas para eluir o DNA do gel. Pode-se incubar a 4°C *overnight* (12-16 horas), se não houver tempo suficiente para completar a eluição.
26. Transfira o conteúdo do tubo para uma coluna SNAP™ acoplada a um tubo coletor. Centrifugue na velocidade máxima em uma microcentrífuga durante 2 minutos.
27. Recolha todos os eluídos (~150 µL); deve-se obter cerca de 900 µL de eluído, dependendo do tamanho do gel. Faça alíquotas de ~200 µL em tubos novos e prossiga para a precipitação com etanol.

Precipitação com etanol

28. Para 200 µL de amostra, adicione os seguintes reagentes:

Acetato de amônio à 7.5 M;	90 µL
Glicogênio	3 µL
Etanol 100%	850 µL

Obs.: As *ditags* com fragmentos de 26 bp purificadas do gel podem ser armazenadas a -20°C neste passo e o “dia 7” pode ser iniciado a partir do item 29.

29. Misture bem e coloque no gelo seco durante 20 minutos.
30. Centrifugue na velocidade máxima em uma microcentrífuga durante 30 minutos a 4°C.
31. Remova o sobrenadante cuidadosamente e descarte-o. (sem tocar no sedimento).
32. Lave o precipitado 2 vezes com 1.000 µL de etanol a 70% gelado.
33. Remova o resíduo de etanol cuidadosamente com uma pipeta e deixe o precipitado secar durante 5-10 minutos.
34. Ressuspenda o precipitado em um volume total de 7,75 µL de LoTE (item 6. Soluções) no gelo e adicione 1 µL de tampão ligação concentrado 10×. Prossiga imediatamente para a reação de ligação.

Dia 7: Formando os Concatâmeros e Realizando a Clonagem**Ligando as ditags de 26bp para formar os concatâmeros**

Linhas gerais – uma vez purificadas em gel, as *ditags* de 26 bp estão prontas para ser ligadas e formar os concatâmeros. As bandas dos concatâmeros têm tamanhos variados (formam um esfregaço – *smear*) e são separadas em um gel de poliacrilamida. As bandas de peso molecular maior são recortadas e purificadas do gel.

- ✓ banhos-maria a 16°C e 65°C;
- ✓ microtubos estéreis de 0,5 e 1,5mL;
- ✓ agulha de 18 G;
- ✓ gelo seco;
- ✓ etanol 100%;
- ✓ etanol 70% gelado;
- ✓ fenol/clorofórmio;
- ✓ gel de poliacrilamida a 8% (15 × 17 cm; pente 0,8 mm);
- ✓ tampão Trisborato/EDTA – TBE;
- ✓ tampão de amostra concentrado 6×;
- ✓ marcador de peso molecular de 100 bp;
- ✓ lâminas novas;
- ✓ solução de brometo de etídio 0,5-2 µg/mL ou *SYBR Green*;

- ✓ reagentes do módulo *Concatâmeros* (mantidos a -20°C).

Reação de ligação

1. Faça a seguinte reação (no gelo) usando o 26 bp de DNA purificado do gel do passo 33.
 DNA 26 bp 7,75 μL
 Tampão ligação concentrado $10\times$ 1 μL
 T4 DNA *ligase* 1,25 μL^*
 Total 10 μL

*Pode ser usado o dobro ou uma enzima com um número maior de unidades/ μL .

2. Incube durante 3 horas a 16°C , dependendo do rendimento das *ditags* com fragmentos de 26 bp.

Obs.: se a intensidade da banda de 26 bp for forte, pode-se fazer a ligação em 1 hora. Se a intensidade da banda de 26 bp for mais fraca, aumente o tempo de ligação para 3 horas ou até *overnight*.

3. Quando a ligação estiver completa, adicione 2 μL de tampão de amostra concentrado $6\times$ à mistura da reação de ligação e aqueça a 65°C durante 10 minutos. Prossiga para a eletroforese em gel.

Eletroforese em gel

4. Centrifugue brevemente a mistura da reação de ligação na velocidade máxima de uma microcentrífuga e aplique a amostra em uma canaleta de um gel de poliacrilamida a 8%. Pule uma canaleta e aplique um marcador de peso molecular de DNA (DNA *ladder*) de 100 bp.
5. Corra a eletroforese até que o corante azul de bromofenol alcance 3 cm do fim do gel.
6. Após a eletroforese, core o gel em uma solução de brometo de etídio 0,5-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e visualize as bandas sob luz ultravioleta.
7. Deve ser observado um esfregaço variando de ~ 100 bp a > 1 kb.

Eluindo o DNA do gel

8. Faça um furo no fundo de um microtubo de 0,5 mL estéril usando uma agulha de 18 G. São necessários dois tubos por canaleta.
9. Usando lâminas novas, recorte os seguintes pedaços do gel:

300 – 500 bp

500 – 800 bp

800 bp – 1 kb

10. Corte cada banda do gel em dois pedaços e coloque cada pedaço em um microtubo de 0,5 mL com furo. Devem-se obter seis tubos com vários pedaços de DNA.
11. Coloque cada microtubo em um tubo de 1,5 mL estéril e centrifugue na velocidade máxima de uma centrífuga durante 2-3 minutos (tenha cuidado para não arrancar as tampas dos tubos). As bandas recortadas serão quebradas em pequenos pedaços e coletadas nos tubos de 1,5 mL.
12. Descarte os tubos de 0,5 mL.
13. Prepare 200 μL de LoTE (item 6. Soluções) /de acetato de amônio a 7,5 M (5:1) e adicione esta mistura ao tubo de 1,5 mL contendo os pedaços de gel. Certifique-se de que todos os pedaços de gel estão cobertos com o tampão. Misture bem por meio de vórtice.
14. Incube a 65°C durante 2 horas para eluir o DNA do gel. Pode-se incubar a 4°C *overnight* (12-16 horas), se não houver tempo suficiente para completar a eluição, e no dia seguinte aquecer a 65°C durante 15 minutos.
15. Transfira o conteúdo do tubo (~ 200 μL) para uma coluna SNAPTM acoplada a um tubo coletor. Centrifugue na velocidade máxima em uma microcentrífuga durante 2 minutos.
16. Transfira os eluídos (~ 200 μL) de cada tubo para um tubo novo e prossiga para a precipitação com etanol.

Precipitação com etanol

17. Adicione o mesmo volume de fenol/clorofórmio a cada tubo contendo o eluído. Agite (vórtice) vigorosamente.
18. Centrifugue na velocidade máxima em uma microcentrífuga durante 5 minutos à temperatura ambiente.
19. Transfira a fase aquosa (superior) (~ 200 μL) de cada tubo para um microtubo de 1,5 mL novo, adicione os seguintes reagentes:

Acetato de amônio a 7,5 M 133 μL

Glicogênio 3 μL

Etanol 100% 1.000 μL

20. Mexa bem e coloque no gelo seco durante 20 minutos.

21. Centrifugue na velocidade máxima em uma microcentrífuga durante 30 minutos a 4°C.
22. Remova o sobrenadante cuidadosamente e descarte-o (sem tocar no precipitado).
23. Lave o precipitado 2 vezes com 1.000 µL de etanol a 70% gelado.
24. Remova o resíduo de etanol cuidadosamente com uma pipeta e deixe o sedimento (*pellet*) secar durante 5-10 minutos.
25. Ressuspense o precipitado em um volume total de 6 µL de LoTE (item 6. Soluções) e prossiga para o item *Clonando os concatâmeros em vetores pZerO[®]-1*.

Clonando os concatâmeros em vetores pZerO[®]-1

- ✓ gelo seco;
- ✓ banhos-maria a 16°C e 37°C;
- ✓ etanol 100%;
- ✓ fenol/clorofórmio;
- ✓ reagentes do *kit* zero de ruído (*background*).

Preparando o pZerO[®]-1

26. Digerir 2 µg de pZerO[®]-1 com *Sph* I como segue:

pZerO [®] -1 (1 µg/µL).....	2,0 µL
tampão 2 concentrada 10×	2,5 µL
<i>Sph</i> I.....	1,4 µL
Água ultrapura estéril.....	19,1 µL
Total	25,0 µL
27. Incube a 37°C durante 15-30 minutos (**Não** digira mais de 30 minutos).
28. Adicione 175 µL de LoTE (item 6. Soluções) à mistura de digestão.
29. Adicione o mesmo volume de fenol/clorofórmio ao tubo. Agite (vórtice) vigorosamente.
30. Centrifugue na velocidade máxima em uma microcentrífuga durante 5 minutos à temperatura ambiente.
31. Transfira a fase aquosa (superior) (~200 µL) de cada tubo para um microtubo de 1,5 mL novo.
32. Adicione 65 µL de acetato de amônio a 7,5 M e 600 µL de etanol 100%.
33. Mexa bem e coloque no gelo seco durante 10 minutos.
34. Centrifugue na velocidade máxima em uma microcentrífuga durante 30 minutos a 4°C.

35. Remova o sobrenadante cuidadosamente e descarte-o (sem tocar no precipitado).
36. Lave o precipitado duas vezes com 1.000 µL de etanol a 70% gelado.
37. Remova o resíduo de etanol cuidadosamente com uma pipeta e deixe o sedimento secar durante 5-10 minutos.
38. Ressuspense o precipitado em um volume total de 50 µL de LoTE (item 6. Soluções).
39. Avalie a eficiência da digestão analisando 2 µL desta em um gel de agarose 1% (compare o resultado da digestão com 1 µL de pZerO[®]-1 não digerido).
40. Prossiga para o item *Ligando os concatâmeros ao pZerO[®]-1*.

Ligando os concatâmeros ao pZerO[®]-1

41. No gelo, prepare a seguinte reação de ligação (10 µL) para cada um dos *pools* de DNA (Tabela 12.1).
42. Incube durante 3 horas a 16°C (não faça a ligação em temperatura ambiente).
43. Ajuste o volume para 200 µL com LoTE (item 6. Soluções).
44. Adicione o mesmo volume de fenol/clorofórmio ao tubo. Agite (vórtice) vigorosamente.
45. Centrifugue na velocidade máxima em uma microcentrífuga durante 5 minutos à temperatura ambiente.
46. Transfira a fase aquosa (superior) (~200 µL) de cada tubo para um microtubo de 1,5mL novo.
47. Adicione 133 µL de acetato de amônio 7,5 M, 3 µL de glicogênio e 600 µL de etanol 100%.
48. Mexa bem e coloque no gelo seco durante 10 minutos.
49. Centrifugue na velocidade máxima em uma microcentrífuga durante 30 minutos a 4°C
50. Remova o sobrenadante cuidadosamente e descarte-o (sem tocar no precipitado).
51. Lave o precipitado **4 vezes** com 1.000 µL de etanol 70% gelado.
52. Remova o resíduo de etanol cuidadosamente com uma pipeta e deixe o precipitado secar durante 15-20 minutos.
53. Ressuspense o precipitado de cada tubo em 12 µL de LoTE (item 6. Soluções) e siga para o passo de **Transformação**.

Transformação

- ✓ agitador a 37°C;
- ✓ placas de Petri com meio de cultura (item 8. Soluções) LB (*low salt*-ágar) contendo 50 µg/mL Zeocin™;
- ✓ reagentes do *kit* One Shot® TOP10 Electrocomp™ *E. coli* (se preferir usar outras células competentes, siga as instruções do fabricante ou do seu laboratório).

54. Deixe o meio SOC à temperatura ambiente.
55. Aqueça as placas de Petri (com meio de cultura LB contendo 50 µg/mL Zeocin™) a 37°C.
56. Coloque uma alíquota de One Shot® TOP10 Electrocomp™ *E. coli*.
57. Coloque as cubetas de eletroporação também no gelo.
58. Adicione 1-2 µL de uma das reações de ligação (por exemplo, 300 bp – 500 kb) em 50 µL de One Shot® TOP10 Electrocomp™ *E. coli* e misture gentilmente. Não misture por pipetagem, evitando a formação de bolhas.
59. Transfira a mistura (células + ligação) para uma cubeta de 0,1cm.
60. Eletropore as amostras utilizando o protocolo do seu eletroporador.
61. Adicione 250 µL de meio SOC (temperatura ambiente) à cubeta. Transfira para um tubo de 1,5 mL e deixe sob agitação no agitador (200 rpm; 37°C).
62. Adicione 750 µL de meio SOC ao tubo e misture bem.
63. Distribuir 100 µL da transformação em uma placa de Petri com meio de cultura LB contendo 50 µg/mL Zeocin™ e incube *overnight* (12-16 horas) a 37°C.
64. Armazene o restante da transformação a 4°C. No próximo dia, dependendo do número de colônias observa-

das, distribua todo o restante da transformação em uma única placa de Petri ou, então, faça uma diluição para obter um número adequado de colônias por placa.

65. Repita o procedimento para as demais bibliotecas (500 - 800 bp, 800 bp - 1 kb).

Obs.: Uma reação de ligação eficiente deve produzir pelo menos 100-150 colônias por placa.

Dias 8-9: Análise dos Clones Transformantes por meio de PCR de Colônia e Sequenciamento

Análise dos clones transformantes por meio de PCR de colônia

- ✓ palitos de dentes estéreis;
- ✓ meio de cultura SOB (item 9. Solução) contendo 50 µg/mL Zeocin™;
- ✓ placa de cultura em fundo U;
- ✓ placa de 96 orifícios para PCR;
- ✓ oligonucleotídeo M13 *sense* (CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG);
- ✓ oligonucleotídeo M13 *antisense* (TCACACAGGAAACAGCTATGAC);
- ✓ *Taq* DNA polimerase;
- ✓ dNTP *mix*;
- ✓ gel de agarose 1%.

Cultivo das bactérias recombinantes

1. Com o auxílio de palitos de dentes estéreis, transfira as colônias da placa de Petri para uma placa de cultura em fundo U contendo 100 µL de meio SOB (50 µg/mL Zeocin™) e deixe crescendo a 37°C *overnight* (12-16 horas).

Tabela 12.1 – Reação de ligação dos concatâmeros ao pZerO-1.

Reagente	Amostra	DNA	Ligação
Concatâmeros	6 µL		
pZerO®-1/Sph I	1 µL	1 µL	1 µL
Tampão <i>ligase</i> 10×	1 µL	1 µL	1 µL
T4 DNA <i>ligase</i>	2 µL	2 µL	
Água estéril	-	6 µL	8 µL

PCR de colônias

2. Prepare a reação de PCR (no gelo) conforme descrito no quadro 12.9.

Quadro 12.9 – Reação da PCR de colônias.

H ₂ O ultrapura	10,25 µL
Tampão de reação da PCR concentrado 10×..1,5 µL	
dNTPs (1,25 mM)	1,5 µL
MgCl ₂	0,45 µL
M13 F (20 µM)	0,1 µL
M13 R (20 µM)	0,1 µL
Taq DNA polimerase	0,1 µL
Meio de cultura + bactérias	1,0 µL
Total	15,0 µL

Agite (Vórtice) e faça uma centrifugação rápida (*Spin*)

Cilo da reação da PCR

95°C - 3 minutos;

95°C - 40 segundos; 55°C - 40 segundos; 72°C - 55 segundos (35 ciclos);

72°C - 5 minutos;

4°C ∞.

3. Analise o resultado da PCR em gel de agarose 1%. O tamanho das bandas correspondentes aos insertos de ser proporcional ao tamanho da biblioteca analisada (300 – 500 bp, 500 – 800 bp ou 800 bp – 1 kb).

Sequenciamento

4. Utilize o protocolo estabelecido para o aparelho que será utilizado no sequenciamento da biblioteca de SAGE. Obtivemos bons resultados fazendo as PCR de colônias com os oligonucleotídeos M13 *sense* e *antisense* e, no sequenciamento, utilizamos o oligonucleotídeo SP6 (ATTAGGTGACACTATAG).
5. Com o sequenciador ABI 3100 (*Applied Biosystems*) com 16 capilares, você pode sequenciar em média 3 placas de 96 amostras por dia. Isso representa uma capacidade média de produção de cerca de 7.200 etiquetas/dia e 36.000 etiquetas/semana.

Forma de Análise dos Resultados

A análise do perfil de expressão gênica em larga escala não é uma tarefa trivial e requer a capacidade de gerar dados de expressão, organizando-os em um

banco de dados e interpretando-os de forma eficiente. O desenvolvimento de novas ferramentas de Bioinformática e o uso de abordagens já disponíveis também são necessários para a interpretação desses bancos de dados.

Uma das vantagens de SAGE é que os resultados podem ser disponibilizados publicamente e diferentes laboratórios podem comparar seus dados *on-line* (www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE; www.sagenet.org; www.genzyme.com/sage/welcome; <http://cgap.nci.nih.gov/SAGE>), sendo uma fonte valiosa para a comparação de dados gerados internamente ou na busca de marcadores. Na página eletrônica do SAGE Genie (<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE>) foram encontradas (junho de 2006) mais de 26 milhões de SAGE *tags* provenientes de mais de 300 tipos celulares humanos. A grande maioria das bibliotecas (290) foi construída com o procedimento original de SAGE, gerando as etiquetas curtas (*short tags*) (aproximadamente 21 milhões de *etiquetas*). As demais bibliotecas (55) foram produzidas com o protocolo de *long SAGE* e geraram aproximadamente 5,5 milhões de *etiquetas*.

As *etiquetas* geradas com o uso da técnica de SAGE podem ser analisadas por meio de programas específicos como o desenvolvido pela equipe criadora da técnica, o qual se encontra disponível *on-line* (<http://www.sagenet.org>) ou aquele desenvolvido pela empresa Invitrogen™, de acesso livre para todos que adquiriram o *kit* I-SAGE™.

Os *softwares* permitem gerar uma lista de genes mais abundantemente expressos nas diferentes situações avaliadas. Porém, os *softwares* disponíveis são bastante limitados quanto às formas de análises possíveis e normalmente são baseados na produção de uma tabela com a lista de *etiquetas* produzidas por diferentes bibliotecas, e uma comparação com uma lista-padrão de genes conhecidos ou ESTs e suas respectivas *etiquetas* utilizando-se plataformas do tipo *Access*.

O programa gera uma lista de *etiquetas* e quantas vezes cada etiqueta aparece naquela biblioteca, como mostrado na tabela 12.2.

O próximo passo é identificar qual gene deu origem a cada etiqueta e isso é feito pela comparação com bibliotecas virtuais geradas a partir de todas as sequências de cDNA e ESTs disponíveis. Esses bancos de dados estão disponíveis para vários organismos (SAGEmap – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE/> ou SAGE Genie – <http://cgap.nci.nih.gov/SAGE/>), ou então, as etiquetas virtuais podem ser extraídas a partir de um banco de sequências de interesse, a partir da identificação do sítio da enzima de restrição na se-

quência do cDNA. Um exemplo do resultado obtido é mostrado na tabela 12.3.

Já que esses resultados são baseados em sequências bastante curtas e vários fatores podem influenciar na interpretação dos resultados, em nosso laboratório decidimos desenvolver novas formas de análises buscando maior confiabilidade dos resultados. Essas análises estão sendo desenvolvidas em colaboração com o Dr. Paulo Sérgio L. Oliveira, responsável pelo laboratório de Biologia Computacional do InCor. O *script* desenvolvido permite a identificação de *ditags* idênticas, cuja formação parece representar um erro técnico, já que a probabilidade de duas *etiquetas* idênticas se encontrarem e se unirem mais de uma vez em um universo de milhares de *etiquetas* é praticamente zero, bem como a caracterização de *etiquetas* internas.

Após essa análise, obtemos informação quantitativa para alguns tipos de transcritos: (i) *etiquetas* similares a genes conhecidos; (ii) *Unigene clusters* (iii) ESTs; e (iv) *etiquetas* sem similaridade (*no matches*) encontradas nos bancos de dados utilizados.

A identificação correta de cada *tag* ao seu respectivo gene de origem é essencial. A maioria dos grupos de pesquisa utiliza o banco de dados do Unigene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Unigene>) por se tratar de um banco de *clusters* únicos de sequências de cDNA completas e com referência às ESTs depositadas no GenBank.

Um dos problemas encontrados na análise das bibliotecas de SAGE é a presença de genes redundantes. Algumas vezes uma *etiqueta* é compatível com mais de um gene e essa redundância pode ser verdadeira, já que diferentes transcritos podem ter a mesma *etiqueta* simplesmente por acaso, ou por compartilharem domínios. No entanto, muitos bancos de dados têm várias entradas para o mesmo transcrito, depositado por vezes com o mesmo nome ou ainda com nomes diferentes. Além disso, genes que apresentam processamento 3' alternativo também podem influenciar as análises das bibliotecas de SAGE. Transcritos codificados pelo genoma mitocondrial, bem como a contaminação com DNA genômico mitocondrial também podem ser identificados por SAGE.

Transcritos alternativos próximos à cauda poli-A e a sinais de poliadenilação podem ser considerados potencialmente reais. Contudo, *etiquetas* internas podem ser consequência de artefatos experimentais, como, por exemplo, se a síntese do cDNA foi iniciada em algum outro sítio rico em adeninas, que não a cauda poli-A, ou se a digestão com a enzima *Nla* III não foi completa e

então gera uma *etiqueta* que não corresponde à *etiqueta* real, que estaria mais a 3' do transcrito.

Atualmente, um dos maiores desafios na análise das bibliotecas de SAGE é um endereçamento perfeito entre a *etiqueta* e seu respectivo transcrito. Vários projetos (SAGE map, CGAP SAGE, SAGE Genie) buscam melhor identificação das *etiquetas*, avaliando todos os possíveis desvios, bem como melhor análise e disseminação dos resultados.

Após a identificação do perfil de expressão em uma dada amostra ou conjunto de amostras utilizando-se a técnica de SAGE, é aconselhável que as diferenças de expressão sejam confirmadas por meio de técnicas mais sensíveis como a PCR em tempo real (*Real Time PCR*) ou *Northern blot*, que sejam dirigidas para os genes selecionados, a fim de se verificar se as diferenças de expressão são confirmadas em amostras independentes e por meio de outras metodologias.

Soluções

1. Tampão de lavagem A

10 mM de Tris-HCl, pH 7,5
0,15 M de LiCl
1 mM de EDTA
0,1% sulfato de lítio de dodecila a 0,1%
10 µg/mL de glicogênio

2. Tampão de lavagem B

10 mM de Tris-HCl, pH 7,5
150 mM de LiCl
1 mM de EDTA
10 µg/mL de glicogênio

3. Tampão de lavagem C

5 mM Tris, pH 7,5
0,5 mM de EDTA
1 M de NaCl
Sulfato de sódio dodecila a 1% (SDS)
10 µg/mL glicogênio

4. Tampão de lavagem D

5 mM de Tris, pH 7,5,
0,5 mM de EDTA
1 M de NaCl
200 µg/mL de albumina sérica bovina (BSA)

5. Tampão de lise e de ligação

5 mM de Tris-HCl, pH 7,5
500 mM de LiCl
10 mM de EDTA
Sulfato de lítio dodecila a 1%
5 mM de DTT

6. LoTE

3 mM de Tris-HCl, pH 7,5
0,2 mM de EDTA, pH 7,5

7. Tampão de corrida concentrado 6×

100 μ L de EDTA 0,5 M
1,5 g de Ficoll™ Type 400
1,5 mL de azul de bromofenol a 1%
1,5 mL de xileno ciano a 1%
Completar para 10 mL com água ultrapura.

8. Meio de cultura LB (*low salt*-ágar)

10 g de triptona
5 g extrato de levedura
5 g NaCl

Acrescentar em 950 mL de água ultrapura e dissolver no agitador. Ajustar o pH da solução para 7,5 com NaOH a 5 M. Adicionar 15 g de ágar e ajustar o volume para 1 litro. Autoclavar durante 20 minutos. Deixar a solução resfriar até aproximadamente 55°C e adicionar a solução-estoque de 100 mg/mL de Zeocin™ para

atingir a concentração final de 50 μ g/mL (500 μ L/litro de meio de cultura). Distribuir nas placas de Petri.

9. Meio de cultura SOB

20 g de triptona
5 g de extrato de levedura
0,5 g de NaCl
2,5 mM de KCl
10 mM de MgCl₂

Dissolver 20 g de triptona, 5 g de extrato de levedura e 0,5 g de NaCl em 950 mL de água ultrapura. Adicionar 10 mL de uma solução de KCl 250 mM (1,86 g de KCl em 100 mL de água ultrapura). Ajustar o pH para 7,5 com NaOH a 5 M e completar com água ultrapura para 1 litro. Autoclavar a solução; quando resfriar a ~55°C, adicionar 10 mL de MgCl₂ 1 M estéril. Adicionar a solução-estoque de 100 mg/mL de Zeocin™ para atingir a concentração final de 50 μ g/mL (500 μ L/litro de meio de cultura). Armazenar à temperatura ambiente ou +4°C.

Tabela 12.2 – *Tags* gerados após o sequenciamento e análise de uma biblioteca de SAGE e o número de vezes que cada *tag* foi sequenciado. Esse número é proporcional à expressão daquele gene.

<i>Tag</i> (sequência)	Contagem
GGGGTGCTGT	171
GAACGCCTAA	168
TGTACCTGTA	139
TACCATCAAT	120
GGGGTAAGAA	47
ACGCAGGGAG	32
GCCGCCTGGA	27
GTAGGTGAGG	18
CTGTTGCTGG	14
GGCTGTACCC	13
ACCTGTATCC	11
AGGATGTGGG	3

Tabela 12.3 – Tags gerados 5, número de vezes sequenciado e mapeamento indicando qual o gene aquele tag representa.

Tag (sequência)	Contagem	Nome do gene
GGGGTGCTGT	171	DNM1 - <i>Dynamin 1</i>
GAACGCCTAA	168	DPYSL2 - <i>Dihydropyrimidinase-like 2</i>
TGTACCTGTA	139	TUBA3 - <i>Tubulin, alpha 3</i>
TACCATCAAT	120	GAPDH - <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GGGGTAAGAA	47	PEBP1 - <i>Phosphatidylethanolamine binding protein 1</i>
ACGCAGGGAG	32	MALAT1 - <i>Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)</i>
GCCGCCTGGA	27	SPTBN4 - <i>Spectrin, beta, non-erythrocytic 4</i>
GTAGGTGAGG	18	TERF2IP - <i>Telomeric repeat binding factor 2, interacting protein</i>
CTGTTGCTGG	14	ZNF664 - <i>Zinc finger protein 664</i>
GGCTGTACCC	13	CSRP1 - <i>Cysteine and glycine-rich protein 1</i>
ACCTGTATCC	11	IFITM3 - <i>Interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)</i>
AGGATGTGGG	3	KIF1C - <i>Kinesin family member 1C</i>

Glossário

SAGE™ Etiqueta ou Etiqueta – sequência de 9-14 bp de cada cDNA contendo um sítio de reconhecimento de *Nla* III em seu 3' proximal.

Ditag – duas *etiquetas* unidas final com final.

Ditag 100 bp e ditag 26 bp – os termos *100 bp dietiqueta* e *26 bp dietiqueta* referem-se ao tamanho da *dietiqueta*, porém, o valor real da *dietiqueta* de 100 bp pode variar de 102 a 106 bp, dependendo do tamanho do adaptador e das *etiquetas*. Da mesma forma, o tamanho da *dietiqueta* de 26 bp pode variar de 26 a 30 bp, dependendo do tamanho do adaptador e das *etiquetas*, sendo que a *BsmF* I cliva em média 14 ou 15 bases (a 65°C) à frente de seu sítio de restrição (*downstream*). Os “nomes” das *dietiquetas* (100 bp ou 26 bp) são baseados na técnica de SAGE™ original, na qual era utilizada a enzima *Fok* I (que criava uma etiqueta de 9 bp), agora substituída pela enzima *BsmF* I (cria uma *etiqueta* de 14-15 bp) ou pela enzima *Mme* I no LongSAGE, a qual libera uma *etiqueta* com 17 a 21 bp.

Contatâmetro – *digats* unidas final com final para formar uma molécula de DNA de 20-50bp.

Enzima de ancoragem – endonuclease com um sítio de restrição de 4 bp e que cliva em uma distância definida (10-14 bp), *downstream*, do sítio de reconhecimento. A *BsmF* I é usada como geradora de *etiqueta* neste kit.

Adaptador – oligonucleotídeos com aproximadamente 40 bp contendo um sítio de restrição Type IIS no final 3', um final coesivo complementar ao sítio de restrição da

enzima *Nla* III, além de sítios para o anelamento de oligonucleotídeos para a amplificação por PCR

Links úteis

SAGE net: <http://www.sagenet.org/>

SAGE Genie: <http://cgap.nci.nih.gov/SAGE/>

SAGE map: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE/>

Download SAGE data: <https://nci.nih.gov/pub/SAGE/human> e [ftp1.nci.nih.gov/pub/SAGE](https://nci.nih.gov/pub/SAGE)

SAGE and RAGE site of the M. D. Anderson Cancer Center: <http://sciencepark.mdanderson.org/labs/ggeg/>

Referências

- Azevedo, M. de O. Contrifugação. In: Técnicas Básicas em Biologia Molecular. Azevedo, M. de O.; Felie, M.S.S.; Brígido, M. de M.; Maranhão, A.Q.; De-Souza, M.T. eds. Editora Universidade de Brasília, 2003, Cap. II.
- Boon, K.; Osorio, E.C.; Greenhut, S.F.; Schaefer, C.F.; Shoemaker, J.; Polyak, K.; Morin, P.J.; Buetow, K.H.; Strausberg, R.L.; De Souza, S.J.; Riggins, G.J.; An anatomy of normal and malignant gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:11287-11292, 2002.
- Charpentier, A.H.; Bednarek, A.K.; Daniel, R.L.; Hawkins, K.A.; Laffin, K.J.; Gaddis, S.; MacLeod, M.C.; Aldaz, C.M.; Effects of estrogen on global gene expression: identification of novel targets of estrogen action. *Cancer Res.*, 60: 5977-5983, 2000.

- Chen, J.; Sun, M.; Lee, S.; Zhou, G.; Rowley, J.D.; Wang, S.M.; Identifying novel transcripts and novel genes in the human genome by using novel SAGE tags. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:12257-12262, 2002.
- Datson, N.A.; van der Perk-de Jong, J.; van den Berg, M.P.; de Kloet E.R.; Vreugdenhil, E. MicroSAGE: a modified procedure for serial analysis of gene expression in limited amounts of tissue. *Nucleic Acids Res.*, 27:1300-1307, 1999.
- He T.C.; Sparks, A.B.; Rago, C.; Hermeking, H.; Zawel, L.; da Costa, L.T.; Morin, P.J.; Vogelstein, B.; Kinzler, K.W.; Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281:1509-1512, 1998.
- He, T.C.; Chan, T.A.; Vogelstein, B.; Kinzler K.W.; PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell*, 99:335-345, 1999.
- Inadera, H.; Hashimoto, S.; Dong H.Y.; Suzuki, T.; Nagai, S.; Yamashita, T.; Toyoda, N.; Matsushima, K. WISP-2 as a novel estrogen-responsive gene in human breast cancer cells. *Biochem. Biophys Res. Commun.*, 275:108-114, 2000.
- Lal, A.; Lash, A.E.; Altschul, S.F.; Velculescu, V.; Zhang, L.; McLendon, R.E.; Marra, M.A.; Prange, C.; Morin, P.J.; Polyak, K.; Papadopoulos, N.; Vogelstein, B.; Kinzler K.W.; Strausberg, R.L.; Riggins, G.J.; A public database for gene expression in human cancers. *Cancer Res.*, 59: 5403-5407, 1999.
- Lee, S.; Chen, J.; Zhou, G.; Wang, S.M.; Generation of high-quantity and quality tag/ditag cDNAs for SAGE analysis. *Biotechniques* 31: 348-350, 352-344, 2001.
- Madden, S.L.; Wang, C.J.; Landes, G.; Serial analysis of gene expression: from gene discovery to target identification. *Drug Discov Today* 5:415-425, 2000.
- Margulies, E.H.; Innis, J.W.; eSAGE: Managing and analysing data generated with serial analysis of gene expression (SAGE). *Bioinformatics*, 16:650-651, 2000.
- Matsumura, H.; Reich, S.; Ito A.; Saitoh, H.; Kamoun, S.; Winter, P.; Kahl, G.; Reuter, M.; Kruger, D.H.; Terauchi, R. Gene expression analysis of plant host-pathogen interactions by SuperSAGE. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 15718-15723, 2003.
- Saha, S.; Bardelli, A.; Buckhaults, P.; Velculescu, V.E.; Rago, C.; St. Croix B et al. A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. *Science*, 294:1343-1346, 2001.
- Saha, S.; Sparks, A.B.; Rago, C.; Akmaev, V.; Wang, C.J.; Vogelstein, B.; Kinzler, K.W.; Velculescu, V.E.; Using the transcriptome to annotate the genome. *Nat. Biotechnol.*, 20:508-512, 2002.
- Velculescu, V.E.; Zhang, L.; Vogelstein, B.; Kinzler, K.W.; Serial Analysis of Gene Expression. *Science*, 270:484-487, 1995.
- Velculescu, V.E.; Vogelstein B.; Kinzler K.W.; Analysing uncharted transcriptomes with SAGE. *Trends Genet.*, 16:423-425, 2000.
- Vilain, C.; Libert, F.; Venet, D.; Costagliola, S.; Vassart, G.; Small amplified RNA-SAGE: an alternative approach to study transcriptome from limiting amount of mRNA. *Nucleic Acids Res.*, 31: c24, 2003.
- Virlon, B.; Cheval, L.; Buhler, J.M.; Billon, E.; Doucet, A.; Elalouf, J.M.; Serial microanalysis of renal transcriptomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:15286-15291, 1999.
- Wu, C.G.; Forgues, M.; Siddique, S.; Farnsworth, J.; Valerie, K.; Wang, X.W.; SAGE transcript profiles of normal primary human hepatocytes expressing oncogenic hepatitis B virus X protein. *FASEB J.*, 16:1665-1667, 2002.

13. Repressão da Expressão Gênica em Células em Cultura pela Tecnologia *Antisense*

Claudimara Ferini Pacico Lotfi

Introdução

Oligonucleotídeos *antisense* são utilizados para modular a transferência de informação do gene para a proteína interferindo com a função do RNA mensageiro ou do pré-RNA mensageiro. Basicamente, esta interferência pode ser por meio de dois mecanismos de ação: por clivagem ou não do RNA. No mecanismo de não clivagem do RNA, também chamado de mecanismo de ocupação, a hibridação de um oligonucleotídeo a uma sequência específica de RNA impede a ligação de proteínas regulatórias,

resultando em modulação do processamento, na poliadenilação, na tradução ou na degradação do RNA. No mecanismo de clivagem do RNA estão incluídos o recrutamento e a participação de enzimas endógenas como RNase-H, RNase-P, RNase-L ou por indução de mudanças estruturais no RNA que resulta em degradação (Fig. 13.1).

Oligodeoxinucleotídeos Fosforotioatos

Os oligodeoxinucleotídeos (ODN) mais utilizados são os fosforotioatos, nos quais átomos de oxigênio da ligação

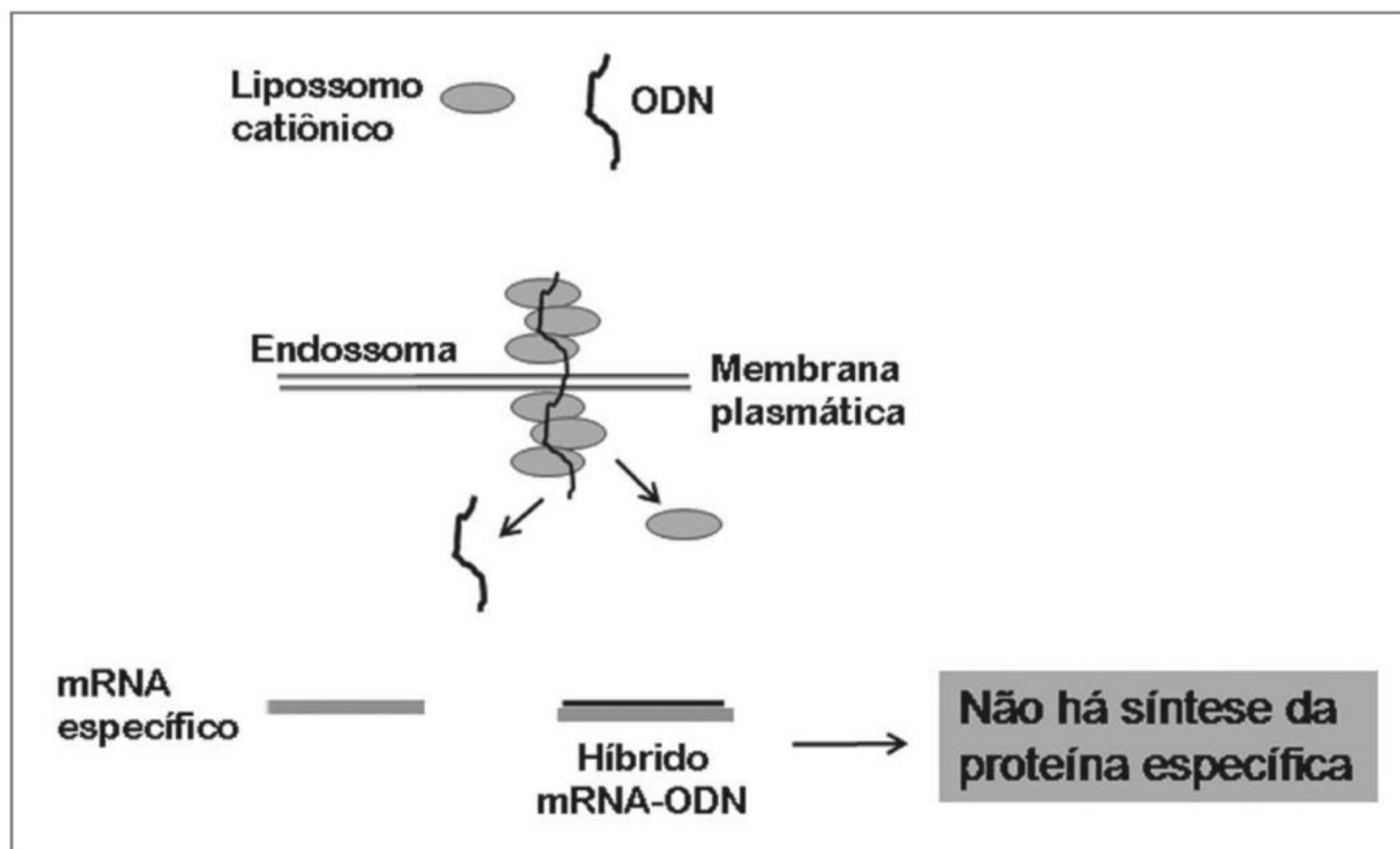


Figura 13.1 – Representação esquemática do mecanismo de ocupação utilizado para modular a transferência de informação do gene para a proteína. ODN-oligonucleotídeo. mRNA-RNA mensageiro. ON= oligonucleotídeo; mRNA = RNA mensageiro.

fosfodiéster são substituídos por átomos de enxofre (S⁻). São moléculas carregadas negativamente e suscetíveis a RNase-H, de forma semelhante aos oligofosfodiésteres, no entanto, os fosforotioatos são mais resistentes à degradação por nucleases que os fosfodiésteres. Esta propriedade intrínseca faz os fosforotioatos, considerados *antisenses* de primeira geração, serem a primeira escolha como *antisense*. No entanto, os fosforotioatos apresentam propriedades adicionais que podem interferir na especificidade e no mecanismo de ação do oligonucleotídeo. As principais são sua natureza polianiónica e a estimulação imunológica, que podem produzir atividades biológicas e efeitos colaterais que comprometem a especificidade e a ação dos fosforotioatos. De maneira geral, estão representados na figura 13.2 os fatores que afetam os mecanismos de ação dos oligonucleotídeos fosforotioatos (exemplo de estudos utilizando fosforotioatos *antisense*, ver Lotfi e Armelin, 2001).

Materiais Necessários

Equipamentos

- Fluxo laminar.
- Incubadora de CO₂.
- Microscópio de luz.
- Microscópio de fluorescência.
- Agitador do tipo gangorra.

- Vórtice.
- Pipetador automático.
- Material plástico estéril para cultura de células.
- Lamínulas estéreis para cultura de células.
- Pipetas para os volumes: 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL e 1.000 µL.
- Ponteiras para as pipetas de 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL e 1.000 µL.
- Recipiente para incubação com o anticorpo (câmara úmida).
- Refrigerador.

Reagentes

- Cultura de células.
- Dimetilsulfóxido (DMSO) estéril e específico para cultura de células.
- Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM).
- Meio de cultivo de células (DMEM + 10% de soro fetal bovino).
- Soro fetal bovino (SFB).
- Tampão fosfato tamponado sem cálcio e magnésio (PBSA).

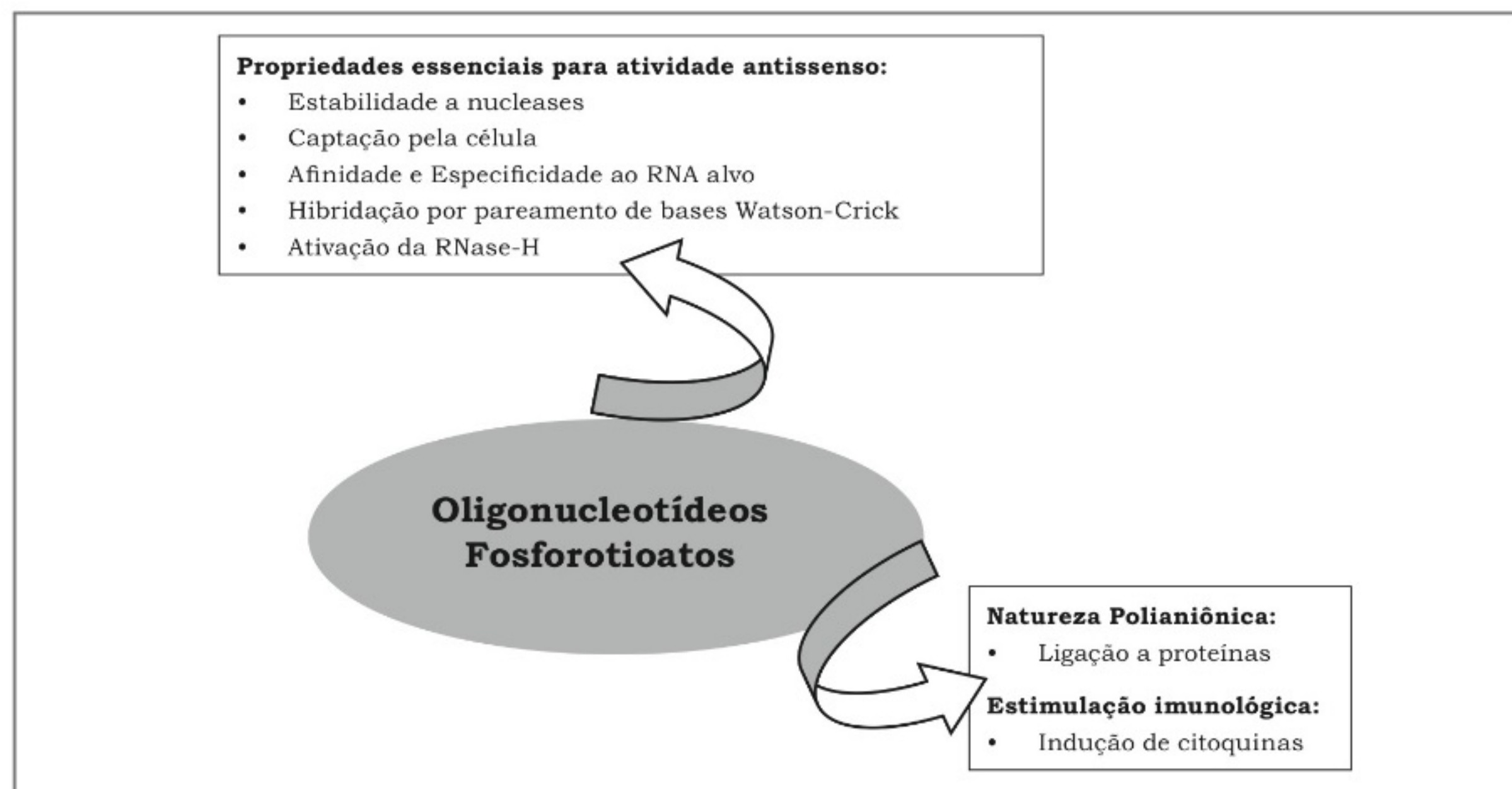


Figura 13.2 – Fatores que afetam o mecanismo de ação dos oligonucleotídeos fosforotioatos.

- Tampão fosfato tamponado com cálcio e magnésio (PBSA).
- Cilindro de CO₂ (5% de CO₂, 95% de ar).
- Oligossintéticos liofilizados – fosforotioatos de 18 merômeros.
- Sequências *antisense* 5'→3' de interesse.
- Sequências *sense* 5'→3' de interesse.
- Anticorpos primários das proteínas de interesse.
- 5-Bromo-2'-dioxiuridina-BrdU.
- Anticorpo anti-BrdU.
- Lipossomos catiônicos.
- Anticorpo secundário anti-IgG de coelho biotinilado.
- Anticorpo secundário anti-IgG com fluoresceína (FITC).
- *Kit* para revelação de imunoperoxidase que contenha o complexo avidina-biotina (ABC).
- 3',3'-Diaminobenzidina e peróxido de amônia em pastilhas (DAB).
- 4',6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI).
- Formaldeído a 37%.
- Metanol.
- Triton X-100.
- Nonidet P-40 (NP-40).
- Carbonato de lítio saturado.

Preparo das soluções: as soluções devem ser preparadas com água purificada em filtros específicos.

As diversas etapas envolvidas na realização do procedimento metodológico estão representadas no fluxograma apresentado na figura 13.3.

Procedimento Experimental

O procedimento experimental é todo realizado em fluxo laminar, empregando-se materiais e soluções estéreis descritos nas tabelas 13.1 a 13.5.

Plaqueamento das Células em Lâminulas de 13 mm

Lâminulas estéreis são colocadas, uma a uma com uma pinça, em placa de Petri e uma alíquota de 40 µL, contendo 2-3×10⁴ células em meio de cultura com soro, é distribuída uniformemente em cada lâmina. As lâminulas são mantidas em estufa de CO₂ por 20-30 min para adesão focal e só então a placa de Petri é completada com meio de cultura com soro (Tabela 13.1).

Carenciamento das Células para Fatores de Crescimento

Após 24-48 horas do plaqueamento, o meio é retirado da placa de Petri e as células aderidas nas lâminulas são lavadas 1× com PBS (Tabela 13.2) e 1×

Tabela 13.1 – Preparo do meio de cultura.

Solução	Preparação	Observações/utilizações
DMEM	Dissolver 13,5 g de meio em 800 mL de água purificada; depois de dissolvido adicionar 1,2 g de NaHCO ₃ e os antibióticos 25 mg de ampicilina (25 mg/L) e 100 mg de sulfato de estreptomicina 100mg/L. Ajustar o pH= 7,4	Se o meio não tiver glicose adicionar 4,5g/L Filtrar em membrana de 0,22 µm Armazenar em geladeira Meio para cultivo de células

Tabela 13.2 – Preparo do tampão fosfato tamponado com cálcio e magnésio.

Solução	Preparação	Observações/utilizações
PBS	Dissolver primeiramente os fosfatos em 700 mL: 1,14g de Na ₂ HPO ₄ de anidro e 0,2 g de KH ₂ PO ₄ . Acrescentar 8,2 g de NaCl, 0,2 g de KCl e MgCl ₂ .6H ₂ O já dissolvidos em 200 mL de água purificada. Por último, acrescentar 0,1 g de CaCl ₂ de anidro. Acertar o pH=7,4 e completar o volume para 1 L.	Filtrar em membrana de 0,22 µm Não deve ser autoclavado porque há precipitação do Ca ²⁺ Armazenar em geladeira

com meio sem soro. Meio sem soro é colocado em outra placa de Petri e as lamínulas são transferidas uma a uma para esta placa e desta um par de lamínulas é transferida para a placa definitiva contendo o meio de carenciamento. As células são mantidas por 48 horas em meio de carenciamento.

Incubação com ODN Sense e Antisense

Soluções recém-preparadas contendo 0,2-40 μM de ODNs e lipossomos (20 $\mu\text{g/mL}$) em meio de cultura sem soro são misturadas em volumes iguais e incubadas por 30 min para a formação dos complexos (Tabela 13.3). Cada par de lamínulas é incubado, de 3-4 h, com 1 mL da solução contendo o complexo ODN-lipossomo pré-formado em proporções crescentes de ODN em relação ao lipossomo, de 0,1 μM :10 μg a 20 μM :10 μg .

São formados vários tipos de complexos e em diferentes proporções como representado na tabela 13.4. Observação: A concentração de lipossomo deve ser testada antes, pois a sensibilidade (viabilidade) ao lipossomo varia conforme o tipo celular.

Estímulo das Células Incubadas com ODN para o Bloqueio da Expressão da(s) Proteína(s) de Interesse

Após a incubação com os complexos ODN-lipossomo (3-4 h) e respectivos controles, as células são estimuladas com fatores que induzam a expressão das proteínas a serem estudadas (Fig. 13.4). Verificar ou estabelecer o tempo de expressão máxima das proteínas de interesse (detecção prévia). Após esse período, as células são lavadas com PBS e fixadas com formaldeído a 3,7% em PBSA por 20 min, lavadas em PBSA e mantidas a 4°C até o processamento por imunocitoquímica (Tabela 13.5).

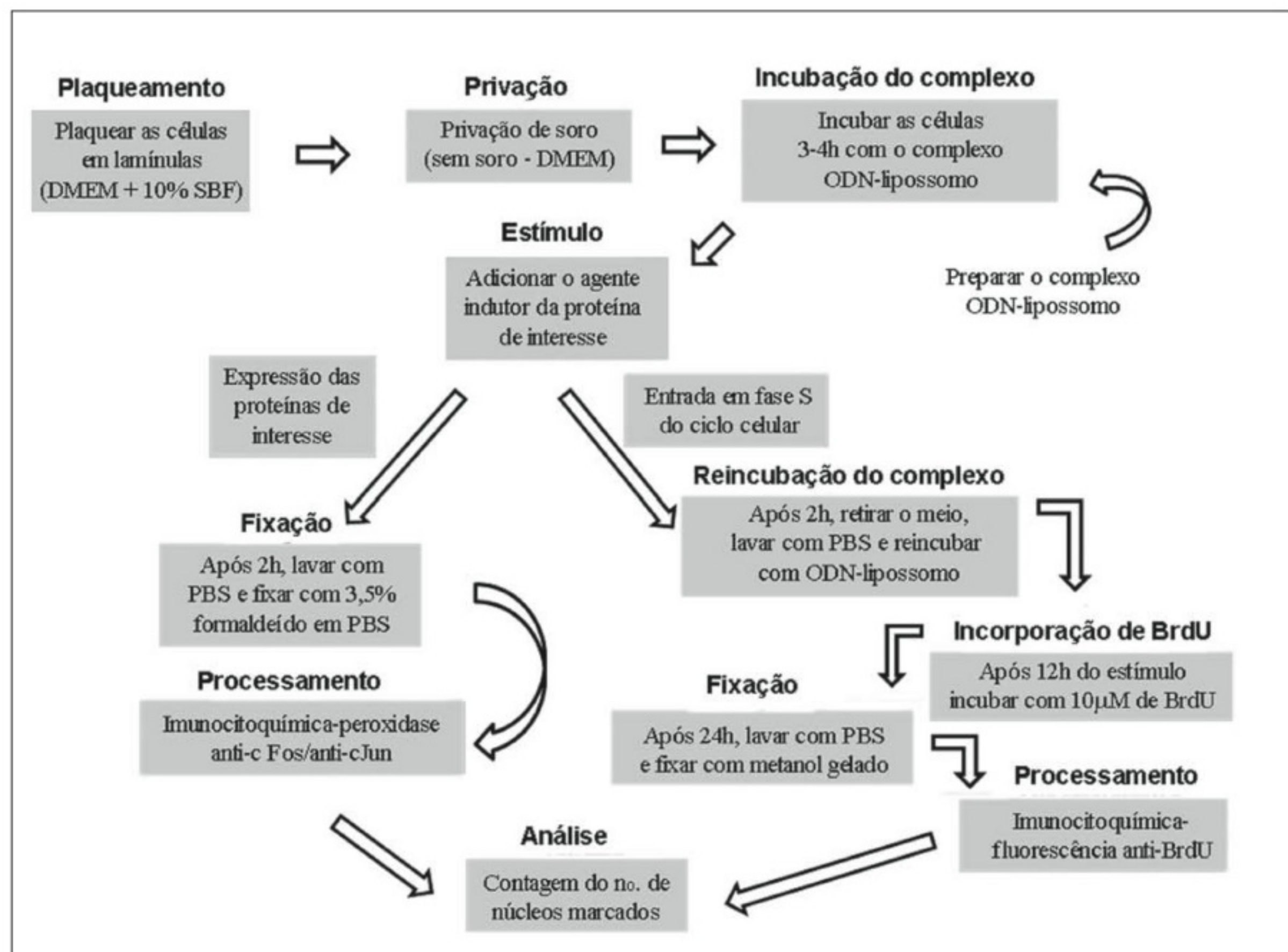


Figura 13.3 – Fluxograma das diversas etapas da técnica de expressão gênica com oligos *antisense*.

Imunocitoquímica para a Detecção da Proteína de Interesse

Observação: As lamínulas contendo as células não podem secar em nenhuma das etapas descritas.

Retirar da geladeira e deixar as lamínulas atingirem a temperatura ambiente. Enquanto isso, marcar em uma tampa de multipoços, de 24 orifícios, os ODNs utilizados e as condições de tratamento. Sobre essa tampa esticar um pedaço de parafilme que será mudado a cada etapa de tratamento. Sobre o parafilme colocar, em cada local referente a um poço, 40 µL de NP40 a 1% em PBS e com uma pinça pegar cada lamínula e colocar sobre a gota com as células voltadas para baixo. Incubar por 20 min à temperatura ambiente. Colocar as lamínulas com as células voltadas para cima em placas (p35 ou multipoços de 6 poços), devidamente marcadas, contendo PBSA e lavar por 3× com PBSA 10 min cada lavagem. Em seguida, depois de trocar o parafilme, colocar 40 µL do soro normalizador a 5% (um soro de animal em que foram feitos os anticorpos secundários) em PBSA com Triton X-100 a 0,3% por 1 h à temperatura

ambiente. Este soro normalizador é fornecido nos *kits* para imunoperoxidase. Lavar 3× com PBSA por 10 min cada lavagem (as lavagens são sempre em placas com o material das lamínulas voltado para cima). Colocar sobre um parafilme novo 40 µL do anticorpo primário na concentração previamente titulada (Tabela 13.5), diluída em PBSA + de Triton X-100 a 0,3% e BSA (1 mg/mL). Deixar *overnight* (16 horas) na geladeira em caixa plástica (câmara úmida) com tampa cujo fundo contenha um material embebido com água. Lavar 3× com PBSA por 10 min cada. Colocar sobre o parafilme 40 µL de anticorpo secundário biotinilado diluído em PBSA + Triton X-100 a 0,3% e incubar por 1 h à temperatura ambiente. Este anticorpo secundário é diluído: para cada 1.000 µL do PBSA + Triton-100, 15 µL do soro normal (1,5%) e 5 µL (0,5%) de anticorpo secundário. Nesta fase, preparar o complexo avidina biotina em PBSA + Triton-100 a 0,3% (complexo ABC) porque é necessário deixá-lo descansando no mínimo por 30 min à temperatura ambiente antes do uso. Lavar 3× com PBSA por 10 min cada. Colocar sobre o parafilme 40 µL do complexo ABC e incubar por 1 h. Retirar as pastilhas de DAB e de peróxido de amônia do *freezer*,

Tabela 13.3 – Preparo das soluções com os ODNs e os complexos ODN-lipossomo.

Solução	Preparação	Observações/utilizações
ODN	Solução estoque: dissolver os oligos liofilizados em água estéril para uma concentração de aproximadamente 1 mM Solução de uso: as concentrações utilizadas foram de 0,2 a 40 µM em DMEM sem soro	Fazer aliquotas da solução-estoque e armazenar em <i>freezer</i> a -80°C A solução de uso não deve ser estocada, depois de utilizada descartar
ODN-lipossomo	Preparar a solução de oligo na concentração entre 0,2 e 40 µM em DMEM sem soro. Preparar a solução de lipossomo de 20 µg/mL em DMEM sem soro. As duas soluções são misturadas em igual volume e incubadas por 30 min, à temperatura ambiente, para a formação dos complexos	A concentração de lipossomo deve ser ajustada para o tipo celular As soluções devem ser preparadas na hora Utilizar o fluxo laminar

Tabela 13.4 – Tipos de ODNs e as proporções utilizadas de ODN e lipossomos.

Tipo de ODN	Relação ODN: lipossomo
Sequência <i>sense</i> da proteína de interesse	20 µM:10 µg/mL
	0,1 µM:10 µg/mL
Sequência <i>antisense</i> da proteína de interesse	20 µM:10 µg/mL
	0,1 µM:10 µg/mL
Lipossomo	0:10 µg
Controle	0:0

pois essas devem ser utilizadas à temperatura ambiente. Uma pastilha de cada para cada 15 mL de água purificada ou destilada. Lavar 3× com PBSA por 10 minutos cada lavagem. Preparar o DAB.

Retirar o PBSA das placas que contêm as lamínulas e adicionar o DAB (trabalhar dentro da capela porque a solução é irritante e com luvas porque há suspeita de carcinogenicidade) de 30 segundos a 1 minuto Retirar o

DAB, reaproveitando-o para outras lamínulas. Lavar as lamínulas com água. Deixar em água até montar as lamínulas nas lâminas. A lâmina deve ser previamente lavada e limpa e marcada com as indicações dos diferentes tratamentos. A lamínula é seca com papel do lado sem material e colada com solução própria para montagem de lâminas, com o material voltado para cima. Deixar secar por alguns minutos. Em nenhuma outra ocasião o material pode ficar seco. Depois de secas as lâminas po-

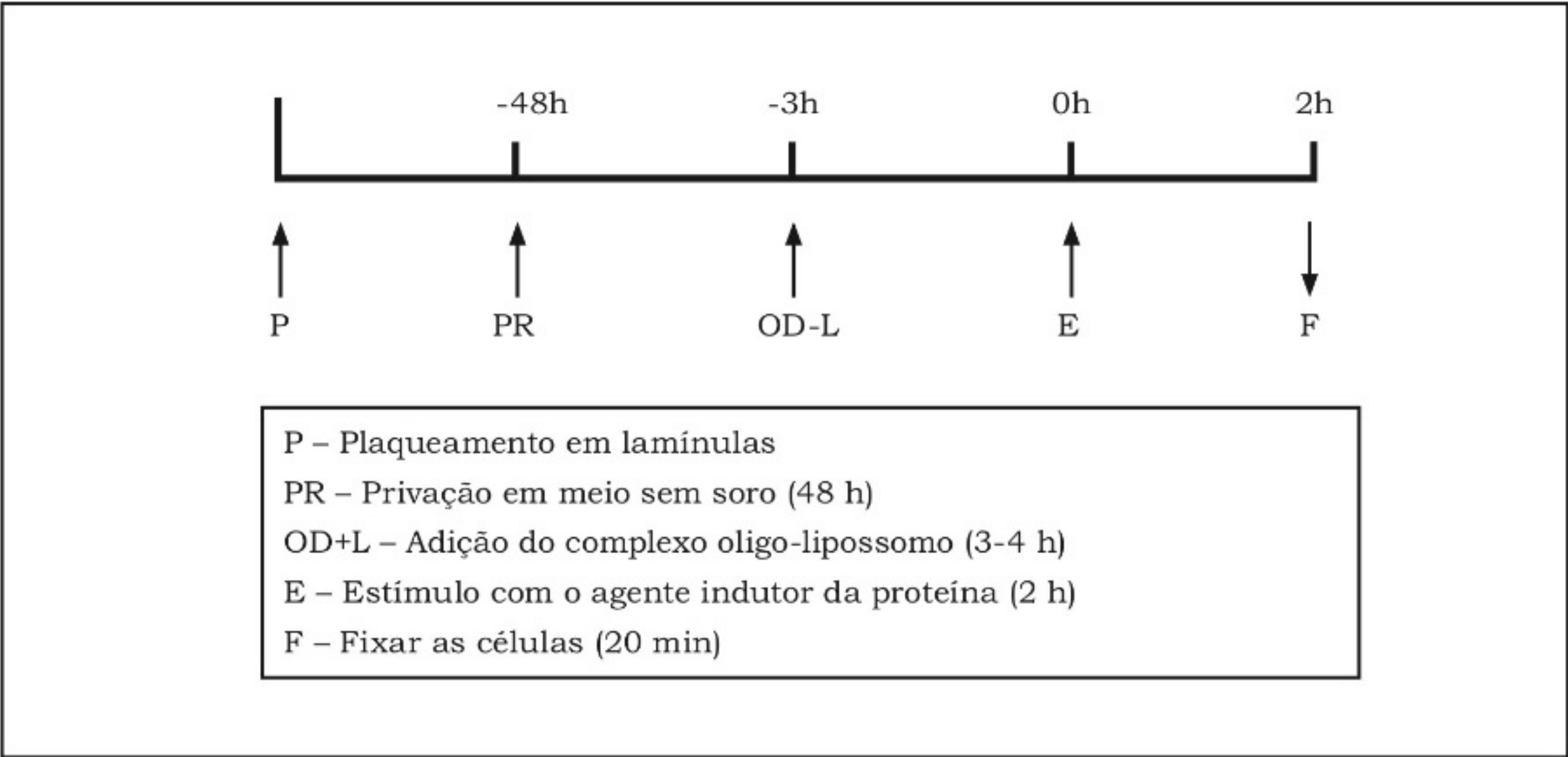


Figura 13.4 – Esquema do protocolo de *antisense* para a detecção da proteína de interesse. Estímulo das células incubadas com ODN para o bloqueio da expressão da(s) proteína(s) de interesse.

Tabela 13.5 – Preparo das soluções utilizadas na reação de imunocitoquímica.

Solução	Preparação	Observações/utilizações
PBSA	Dissolver em 800 mL: 8,2 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,14 g de Na ₂ HPO ₄ de anidro e 0,2 g de KH ₂ PO ₄ . Completar para 1 L	Autoclavar a 120°C por 20 min Armazenar em geladeira
Anticorpos primários	Dissolver os anticorpos primários em PBSA + Triton X-100 a 0,3% + 1 mg/mL de BSA na concentração de 1:1.000	Preparar as diluições na hora do uso
Anticorpos secundários	Dissolver os anticorpos secundários em PBSA + Triton a 0,3% na concentração de 1:1.000	Preparar as diluições na hora do uso

dem ser contracoradas com hematoxilina de Harris (cora núcleo). Quando coradas com hematoxilina, o material pode ser diferenciado em carbonato de lítio saturado que confere à hematoxilina um azul forte. Depois de seca, montar com uma gota de óleo mineral sobre uma lâmina de 18×18 mm. Na extremidade da lâmina quadrada, colocar uma gota pequena de esmalte para não deixar a lâmina se deslocar. Analisar em microscópio de luz. A contagem do número de núcleos marcados é feita contando um total de 500 células por lâmina, separando as marcadas e as não marcadas, isto é, as células que expressam a proteína das que não expressam.

Protocolo Simplificado de Imunoperoxidase

Permeabilização – 20 min em PBSA com Triton X-100 a 0,3% e NP40 a 1%.

Lavagem – 3× com PBSA.

Bloqueio das proteínas inespecíficas – 1 h em PBSA com soro normalizador (NS) a 5%.

Lavagem – 3× por 10 min cada com PBSA.

Reação com o anticorpo primário – 24 ou 48 h em PBSA com Triton X-100 a 0,3% e 1 mg/mL de BSA e o anticorpo na concentração titulada em câmara úmida a 4°C.

Lavagem – 3× por 10 min cada com PBSA.

Reação com o anticorpo secundário biotinilado – 1 h em PBSA com Triton X-100 a 0,3%, NS a 1,5% e de anticorpo secundário biotinilado a 0,5%, à temperatura ambiente.

Lavagem – 3× por 10 min cada com PBSA.

Reação com o complexo AB (ABC) – 1 h em PBSA com Triton X-100 0,3% e 1:1.000 do complexo AB recém-preparado à temperatura ambiente.

Lavagem – 3× por 10 min cada com PBSA.

Reação com DAB – 30 segundos a 1 min em solução com DAB e lavar abundantemente com água destilada ou purificada.

Montagem 1 – em lâminas etiquetadas colocar uma gota de solução de montagem de lâminas mantendo as lâminas com as células para cima, deixar secar.

Coloração – 30 segundos a 2 min em hematoxilina e diferenciada com carbonato de lítio saturado, deixar secar.

Montagem 2 – com lâmina e óleo mineral fixando a lâmina com esmalte e visualizar em microscópio de luz.

Estímulo das Células Incubadas com ODN para Observação das Células que Entram na Fase S do Ciclo Celular

Após a incubação com os complexos e estímulo com o agente indutor da proteína de interesse, as células são lavadas 2× com PBS e reincubadas com meio sem soro contendo os complexos ODN-lipossomo até completar 24 h (Fig. 13.5). Com 12 h do início do tratamento são adicionados ao meio 100 µM de BrdU (bromodioxiuridina) e com 24 h as células são fixadas por 10 min com metanol gelado e mantidas refrigeradas até o processamento por imunofluorescência.

Protocolo de Imunocitoquímica por Reação de Imunofluorescência – Incorporação de BrdU para Análise de Entrada em Fase S do Ciclo Celular

Retirar da geladeira e deixar as lâminas tratadas atingirem a temperatura ambiente. Enquanto isso, marcar em uma tampa de multipoços, de 24 poços, os ODNs utilizados e as condições de tratamento. Sobre essa tampa esticar um pedaço de parafilme que será mudado a cada condição de tratamento. Colocar no lugar correspondente de cada poço 35 µL de anticorpo anti-BrdU (dependendo do fornecedor já vem pronto para o uso) e colocar cada lâmina sobre a gota de anticorpo com o material voltado para baixo, por 30 min à temperatura ambiente. Desvirar as lâminas e colocá-las de volta nas placas com PBSA, com o material para cima, lavar 3× em PBSA, 5 min cada, com agitação em agitador tipo gangorra em velocidade lenta. Trocar o parafilme e colocar 35 µL de anticorpo IgG-FITC (Fab *specific*, 1:50) no lugar correspondente de cada poço e virar as lâminas novamente sobre a gota de anticorpo, por 30 min à temperatura ambiente, cobertos da luz (papel-alumínio). Desvirar as lâminas e colocá-las de volta nas placas com PBSA, com o material para cima, lavar 3× em PBSA, 5 min cada, com agitação lenta e cobertos da luz. Trocar o parafilme e colocar 40 µL de DAPI (5 µg/mL), corante fluorescente com luz ultravioleta que tem afinidade por DNA, por 20 min na tampa do multipoços, colocando o material das lâminas em contato com o corante. A incubação deve ser protegida da luz. Desvirar as lâminas e colocá-las de volta nas placas com PBSA, com o material para cima, lavar 3× em PBSA. Montar as lâminas colando-as com solução de montagem existentes no mercado, com o material para cima, deixar secar, acrescentar uma lâmina com uma gota de óleo mineral sobre o material e fixá-la com uma gota de esmalte. Manter no escuro, em geladeira, até serem analisadas.

Protocolo Simplificado de Imunoperoxidase com Anti-BrdU

Reação com o anticorpo primário – 30 min em 30 μ L de anticorpo anti-BrdU à temperatura ambiente.

Lavagem – 3 \times de 5 min cada com PBSA sob agitação lenta

Reação com o anticorpo secundário com fluoresceína (FITC) – 30 min em 30 μ L de anticorpo IgG-FITC (1:50 em PBSA) à temperatura ambiente.

Lavagem – 3 \times de 5 min cada com PBSA sob agitação lenta e protegido da luz.

Reação com DAPI (5 μ g/mL) – 20 min em solução de DAPI pronta e mantida congelada até o uso, à temperatura ambiente.

Lavagem – 3 \times com PBSA.

Montagem 1 – em lâminas etiquetadas colocar uma gota de solução para montagem de lâminas, mantendo as lamínulas com as células para cima, deixar secar.

Montagem 2 – com lamínula e óleo mineral. Fixar a lamínula com esmalte e visualizar em microscópio de fluorescência.

Fatores que Podem Influenciar a Interpretação Experimental

Pureza do Oligonucleotídeo

Normalmente, os ODN fosforotioatos podem ser preparados com excelente pureza. Diferentes procedimentos de síntese e purificação podem variar de partida para partida quanto ao grau de toxicidade celular e potência.

Estrutura do RNA

A estrutura do RNA tem uma profunda influência na afinidade do ODN e na taxa de ligação do ODN ao RNA-alvo. No entanto, sabemos muito pouco como a estrutura do RNA e a interação RNA-proteína influenciam na ação do ODN.

Variações na Captação e Distribuição do ODNs na Célula In Vitro

Vários estudos têm demonstrado que os ODs entram em células em cultura através de um processo ativo e que essa entrada é variável, dependendo de muitas condições. O tipo celular tem forte influência na captação do oligonucleotídeo, na cinética de entrada e no

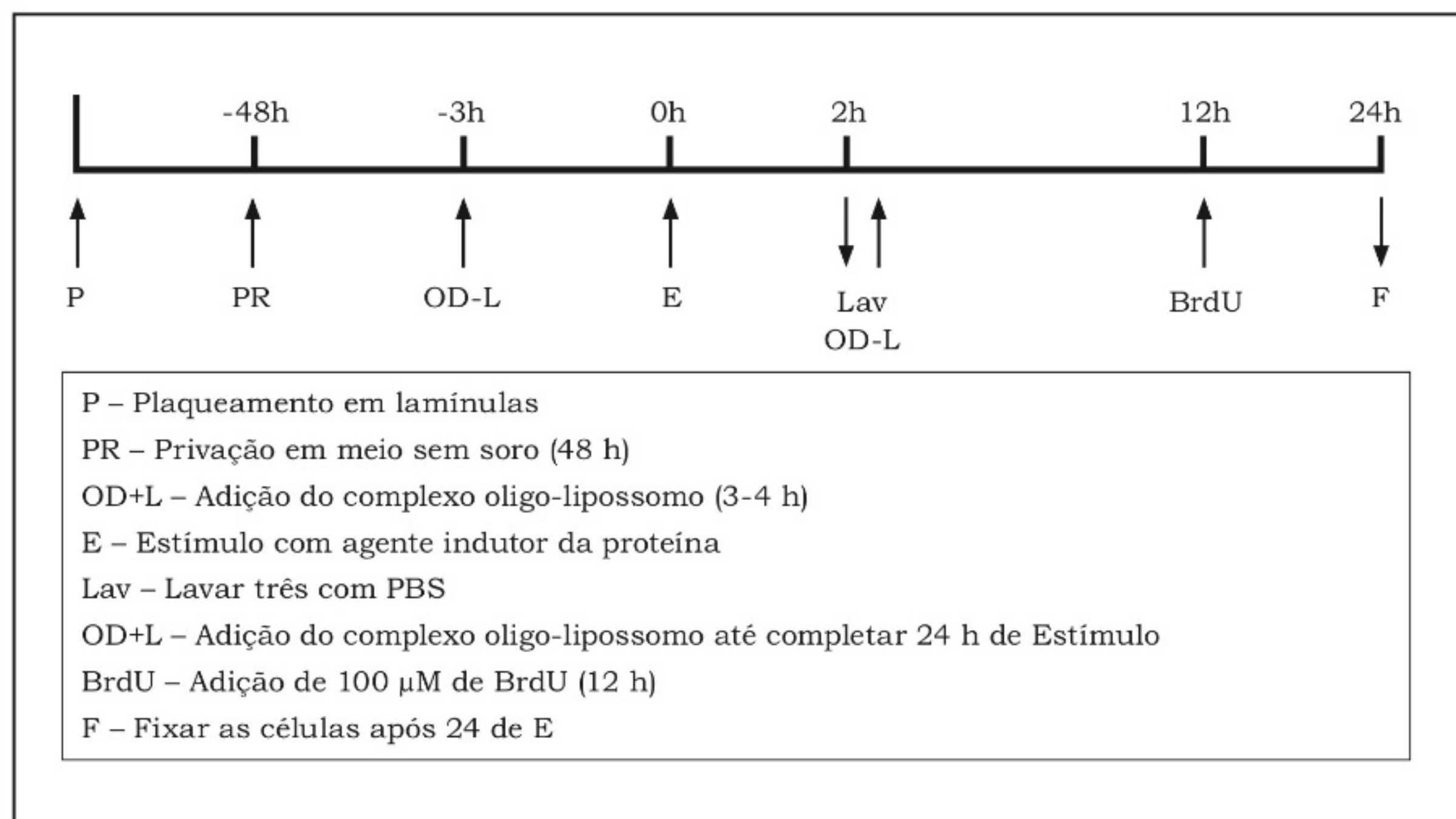


Figura 13.5 - Esquema do protocolo de *antisense* para a detecção da entrada em fases do ciclo celular. Estímulo das células incubadas com ODN para observação das células que entram na fase S do ciclo celular (F).

padrão de distribuição deste na célula. As condições de cultivo das células, como o tipo de meio, o grau de confluência e a presença de soro, podem ter grandes efeitos na captação dos ODNs. A natureza química do oligonucleotídeo obviamente influencia as características da captação e seu mecanismo. A entrada dos fosforotioatos varia em função do comprimento e da sequência, mas não da linearidade. A estabilidade dos ODs nas células é também influenciada pela sequência. Portanto, antes de dizer que um oligonucleotídeo é inativo *in vivo*, ele precisa ser estudado em várias linhagens celulares.

Ligações e Efeitos das Ligações em Alvos Não Nucleotídicos

Oligonucleotídeos fosforotioatos tendem a se ligar a várias proteínas, e essas interações são influenciadas por vários fatores. Elas podem induzir efeitos não *antisense* que podem ser interpretados de forma errada como *antisense* ou complicar a identificação de um mecanismo *antisense*. A ligação a proteínas pode inibir a atividade da RNase-H e com isso inibir a atividade de alguns oligonucleotídeos, além de ter, certamente, consequências toxicológicas. Os oligonucleotídeos em geral podem também se ligar a outras moléculas como lipídios e carboidratos, e tais interações podem, a exemplo do que acontece com as proteínas, ser influenciadas pela natureza química dos oligonucleotídeos estudados.

Efeito dos Oligonucleotídeos Controle

São utilizados vários tipos de oligonucleotídeos controle, *sense*, *mismatch* e também sequências ao acaso. Pouco se sabe sobre o potencial biológico desses controles. No entanto, quando um oligo controle apresenta uma atividade não esperada, o mecanismo desta atividade deve ser

analisado com cuidado antes de concluir que a atividade *antisense* não é devido a um mecanismo *antisense*.

Efeitos Cinéticos

Muitas constantes podem afetar a atividade dos oligonucleotídeos, como velocidade de síntese e degradação do RNA-alvo e da proteína, taxa de captação do oligonucleotídeo pela célula, de distribuição e metabolismo.

Recomendações para a demonstração positiva de mecanismo *antisense* e especificidade.

- É essencial demonstrar efeitos consistentes com um mecanismo *antisense*.
- Analisar a cinética de expressão e degradação do RNA e proteína-alvo.
- Realizar curvas de dose-resposta para a determinação da concentração de lipossomo para o tipo celular.
- Realizar curva dose-resposta para aperfeiçoar a relação oligonucleotídeos-lipossomos.
- Análise de *Northern blotting* para RNA, *Western blotting* ou imunocitoquímica para a proteína-alvo são a melhor escolha.
- Como controle pode ser incluída uma demonstração que RNAs ou proteínas relacionados ao RNA ou proteína-alvo não são afetados.

Referência

- Lotfi, C.F.; Armelin, H.A. c-fos and c-jun antisense oligonucleotides block mitogenesis triggered by fibroblast growth factor-2 and ACTH in mouse Y1 adrenocortical cells. *J. Endocrinol.*, 168(3):381-389, 2001.

14. RNA Interferente como Método para Inativação Gênica

Luciana dos Reis Vasques

Introdução

Após o sequenciamento do genoma de diversos organismos, o grande desafio passou a ser identificar a função dos genes. Existem diversas maneiras de inferir a função de um determinado gene, quer por busca de homologia com genes já descritos em outros organismos, quer por verificação do seu nível de expressão entre diferentes tecidos, ou pela localização da proteína dentro da célula. Entretanto, a função de determinado gene pode melhor ser analisada em sistemas biológicos. Nesse sentido, a cultura de células de mamíferos tem sido uma ferramenta importante no estudo da função dos genes, já que esta pode ser deduzida por meio da análise do fenótipo celular, tanto após a introdução de um gene exógeno, quanto após a inativação de um gene endógeno. Esta mesma manipulação genética pode ser realizada em modelos animais para observação *in vivo* das alterações fenotípicas e possíveis aplicações em terapias gênicas.

Diversas tecnologias vêm sendo desenvolvidas para a inibição da expressão de genes-alvos em sistemas biológicos. Dentre estas, o silenciamento gênico pós-transcricional (*post-transcriptional gene silencing* – PTGS) tem-se mostrado bastante eficiente em células somáticas em cultura, em que a inativação gênica pode ser obtida com maior rapidez e menor custo quando comparada à recombinação homóloga, método muito utilizado para a produção de animais *knockouts*.

O PTGS, como o próprio nome diz, promove a quebra da expressão no nível da transcrição, degradando o RNA do gene-alvo, e pode ser alcançado através da introdução nas células de RNAs *antisense* (RNA-AS), ribozimas ou pequenos RNAs interferentes (*small interfering RNAs* – siRNAs).

Algumas dessas metodologias foram desenvolvidas baseadas em sistemas naturais de defesa celular contra

transposons e infecções virais, como nos casos da interferência por RNA (RNAi), que provoca a clivagem do RNA-alvo por meio de siRNAs, e do RNA-AS, que, por hibridizar ao RNA-alvo, promove sua degradação por RNases. Outra, ainda, está baseada na propriedade catalítica de certas moléculas de RNA como as ribozimas, que promovem o processamento de pré-RNAs em RNAs maduros.

Os três sistemas de inativação gênica citados acima possuem uma característica em comum: envolvem a complementaridade da molécula de inativação com o RNA-alvo. Utilizando estes mecanismos que ocorrem naturalmente nas células de diversos organismos a favor do estudo da função gênica e de aplicações terapêuticas, pode-se direcionar a inativação de um RNA-alvo, desenhando a molécula de inativação. Seguindo as características específicas de cada um dos sistemas apresentados, tal molécula é deduzida por complementaridade, tendo o RNA-alvo como molde. Ela pode, então, ser sintetizada e os oligonucleotídeos obtidos podem ser introduzidos nas células por diferentes métodos, como, por exemplo, a lipotransfecção e a microinjeção, desencadeando a partir destes o processo da inativação gênica.

Outra maneira de desencadear a inativação é a construção de um plasmídeo que contenha a sequência codificadora da molécula de inativação sob o controle transcricional de um promotor conveniente. Uma vez introduzido na célula, o plasmídeo expressará o RNA de inativação.

Interferência por RNA (RNAi)

Dentre as técnicas mencionadas, aquela que se tem mostrado muito eficiente na inativação da expressão gênica é a RNAi. Como dito anteriormente, ela representa um processo biológico que existe naturalmente nas células, sendo bastante conservado entre organismos de diversos

reinos (fungos, plantas e animais). A introdução de vírus, transposons ou de um gene exógeno (obtido, por exemplo, por manipulação gênica) em uma célula pode promover a formação de duplas-fitas de RNA (*double-strand RNA* - dsRNA), as quais vão desencadear a inativação específica do gene de origem. Esta inativação ocorre por meio da ação de uma endonuclease, Dicer, pertencente à família RNase III, que hidrolisa as dsRNAs formando os siRNAs. Cada pequeno RNA, formado por dupla-fita e possuindo de 21 a 23 nucleotídeos (nt), é incorporado no complexo enzimático RISC (*RNA Induced Silencing Complex*), com o auxílio da Dicer. Durante este processo, a dupla-fita é desenrolada e o complexo permanece com apenas uma delas, tornando-se ativo. A simples-fita remanescente é utilizada como guia pelo RISC para a identificação do RNA-alvo, por complementaridade. O RISC ativo, então, é capaz de localizar e clivar especificamente o RNA-alvo. Por não ser degradado durante o processo, o complexo é reciclável, podendo participar da clivagem de várias moléculas (para uma revisão completa veja Hammond, 2005) (Fig. 14.1).

Com base nesse mecanismo biológico, a RNAi está sendo utilizada para o estudo da função gênica com sucesso em plantas, nematódeo e drosófila, por meio da introdução de siRNAs sintéticos (Montgomery et al., 1998; Fire et al., 1998; Misquitta e Peterson, 1999; Tusch et al., 1999; Chuang e Meyerowitz, 2000).

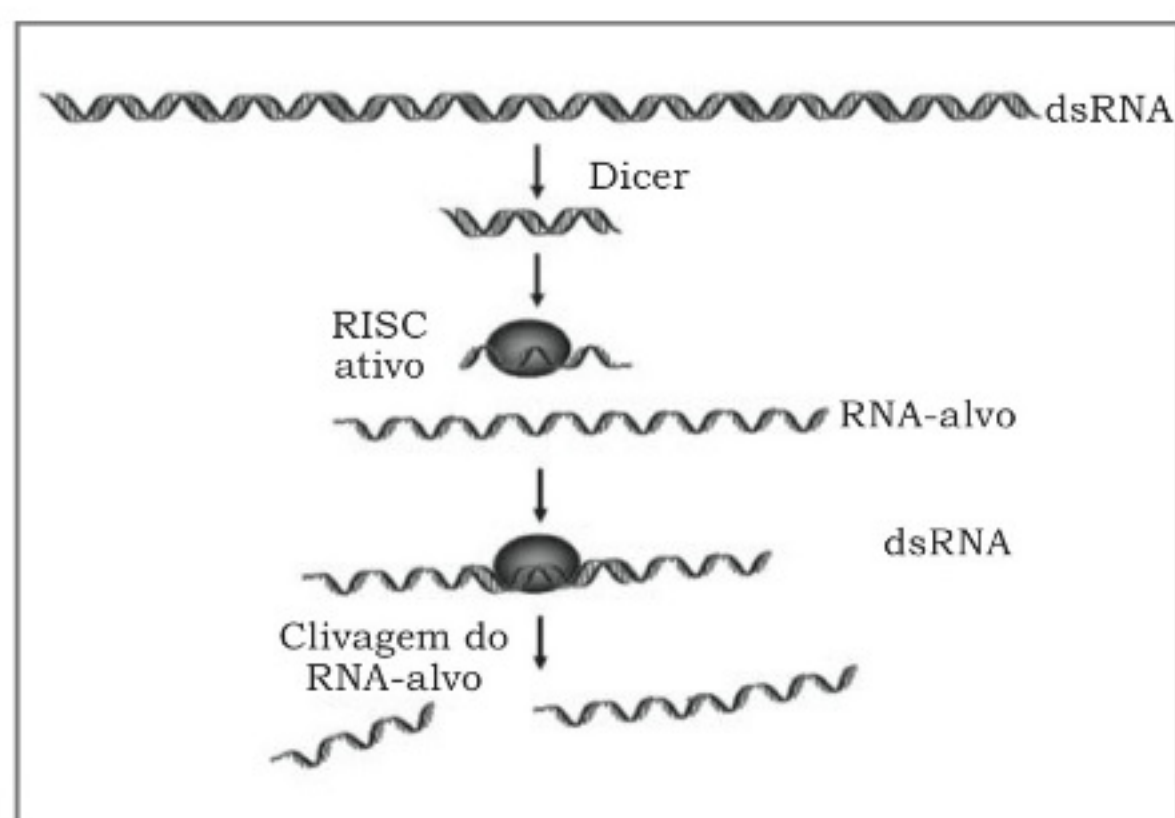


Figura 14.1 – Esquema representativo do processo de inativação gênica por meio da interferência por RNA (RNAi). O processamento de dsRNAs longas pela Dicer produz as dsRNAs pequenas, os siRNAs de 21-23 nucleotídeos. Cada siRNA irá se associar ao complexo RISC. Uma de suas proteínas, uma helicase, auxilia o desenrolar da pequena dupla-fita e torna o complexo RISC ativo. Este agora, com apenas uma das fitas de RNA, será guiado até o RNA-alvo promovendo sua clivagem, por meio da complementaridade do pequeno RNA.

As primeiras tentativas de utilização de RNAi na inativação gênica em mamíferos não foram bem-sucedidas, por desencadear uma degradação inespecífica de diversos RNAs celulares, dando início à resposta ao interferon. Os interferons são um grupo de citocinas ativadas por dsRNAs longas que promovem a inibição global da tradução, gerando a apoptose celular (Kaufman, 1999). Assim, este também é um mecanismo de defesa da célula contra a invasão de vírus e transposons. Entretanto, em 2001, Elbashir et al. conseguiram inativar especificamente o gene de interesse, após definirem o tamanho ideal dos siRNAs: dsRNAs sintéticos de 21 nucleotídeos. Esta metodologia rapidamente se desenvolveu e hoje existem diversas maneiras de se obter o silenciamento por RNAi em células de mamíferos, como, por exemplo, a utilização de plasmídeos de expressão em células eucarióticas. Tais plasmídeos são desenhados para direcionar a expressão de pequenos RNAs em forma de grampo (*short hairpin RNAs* - shRNAs). Uma vez transcritos, estes shRNAs são processados pela Dicer endógena, gerando os siRNAs (Fig. 14.2) (Paul et al., 2002); (Brummelkamp et al., 2002); (Sui et al., 2002).

Além dos plasmídeos de expressão, foram também desenvolvidos sistemas retrovirais para a entrega e produção de shRNAs (Barton e Medzhitov, 2002; Qin et al., 2003; Tiscornia et al., 2003; Robinson et al., 2003). Estes retrovírus têm a vantagem de promover uma entrega mais eficiente dos shRNAs em células primárias e integração no genoma, fenômenos difíceis de serem obtidos por transfecção. A eficiência de entrega de siRNAs foi aumentada ainda mais por Qin et al. (2003), Tiscornia et al. (2003) e Robinson et al. (2003) ao utilizarem vetores lentivirais com código para shRNAs, pois estes possuem a capacidade de transduzir diversos tipos celulares, incluindo células que não encontram-se em divisão. Além disso, estes vetores estão menos sujeitos ao silenciamento gênico imposto a outros tipos de retrovírus. Estas características motivaram Tiscornia et al. (2003) e Robinson et al. (2003) a usarem os lentivírus na obtenção de animais RNAi-transgênicos, demonstrando que estes vetores são capazes de promover o silenciamento gênico nestes. Além disso, Wiznerowicz e Trono, 2003, desenvolveram um modelo droga-induzível que, além de produzir animais RNAi-transgênicos, permite modular a expressão de siRNAs.

Neste contexto atual, em que novas metodologias estão em ampla ascensão para o estudo de função gênica e aplicações terapêuticas, é objetivo deste capítulo fornecer as informações básicas para a utilização da RNAi na inativação gênica em cultura de células.

Obtenção da RNAi em Mamíferos

Identificando um Alvo

As metodologias que serão descritas mais adiante, com exceção daquela que gera siRNAs com diferentes sequências (*pool* de siRNAs), necessitam da identificação prévia de uma região-alvo potencial. Assim sendo, seguem aqui algumas sugestões de como realizar esta seleção.

Como dito anteriormente, o siRNA tem como base, para iniciar o processo de inativação, a complementaridade com o RNA-alvo e idealmente deve possuir entre 19 e 23 nucleotídeos. O siRNA desenhado deve conter, dependendo da estratégia de entrega, diferentes nucleotídeos nas extremidades. No caso da utilização de siRNAs sintéticos (veja adiante), as extremidades 3' devem possuir os nucleotídeos UU ou TT e Elbashir et al. (2002) sugerem que inicie com AA (Fig. 14.3). Já na utilização de vetores de expressão, a sequência codificadora do siRNA deve ter como primeiro nucleotídeo um A, se a região promotora utilizada for H1, ou um G, no caso da região promotora U6. A região mais recomendada para ser

utilizada como alvo é a próxima ao primeiro AUG, códon de início da tradução, distando a jusante deste aproximadamente de 100 a 200 bases. As regiões 3' e 5' não traduzidas (*untranslated regions* – UTRs) devem ser evitadas, uma vez que elas possuem muitos sítios de ligação de proteínas que controlam a tradução. Entretanto, não é sabido se realmente existe uma região ótima que seja regra para todos os RNAs-alvo, pois cada RNA forma estruturas secundárias e terciárias particulares, que podem dificultar a acessibilidade do siRNA à região escolhida. De fato, já foi demonstrada a inativação gênica utilizando diversas regiões ao longo do RNA, incluindo a região 3' – UTR (McManus e Sharp, 2002).

Algumas novas regras foram adicionadas a estas descritas acima, já que um estudo demonstrou que, dependendo da sequência do siRNA utilizado, este teria maior ou menor chance de se associar e de ativar o complexo RISC, aumentando a probabilidade de inativação do RNA alvo. Neste estudo, Reynolds et al. (2004) analisaram 180 siRNAs direcionados para a clivagem do mRNA de 2 genes-alvo, em que oito novas características foram identificadas: 30%-52% GC, pelo menos 3 A/Us na posição 15-19 (fita *sense*), ausência de repetições internas, A nas posições 3, 19 (fita *sense*), U na posição 10 (fita *sense*), G/C não podem ocupar a posição 19 (fita *sense*), e G não pode ocupar a posição 13 (fita *sense*).

Identificada a região-alvo candidata, a etapa seguinte é verificar se esta pequena sequência não está contida em outros RNAs do organismo escolhido para o estudo, garantindo, assim, a inativação específica do gene de interesse. Para isso, é muito importante utilizar um bom banco de dados, como o BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), na busca de similaridades, em que a sequência escolhida não deve possuir mais que 15 nucleotídeo em comum com nenhum outro RNA que não seja o alvo.

Hoje, várias companhias têm investido na produção de *kits* direcionados para a construção siRNAs, utilizando diversas metodologias. Estas empresas disponibilizam na internet programas que localizam as melhores regiões-alvo, como, por exemplo, o *siRNA Target Finder* da Companhia Genscript (www.genscript.com), ou a Dharmacon *siDESIGN* Center da Companhia Dharmacon (<http://www.dharmacon.com/sidesign/>), em que esta última inclui os critérios mais recentes de identificação.

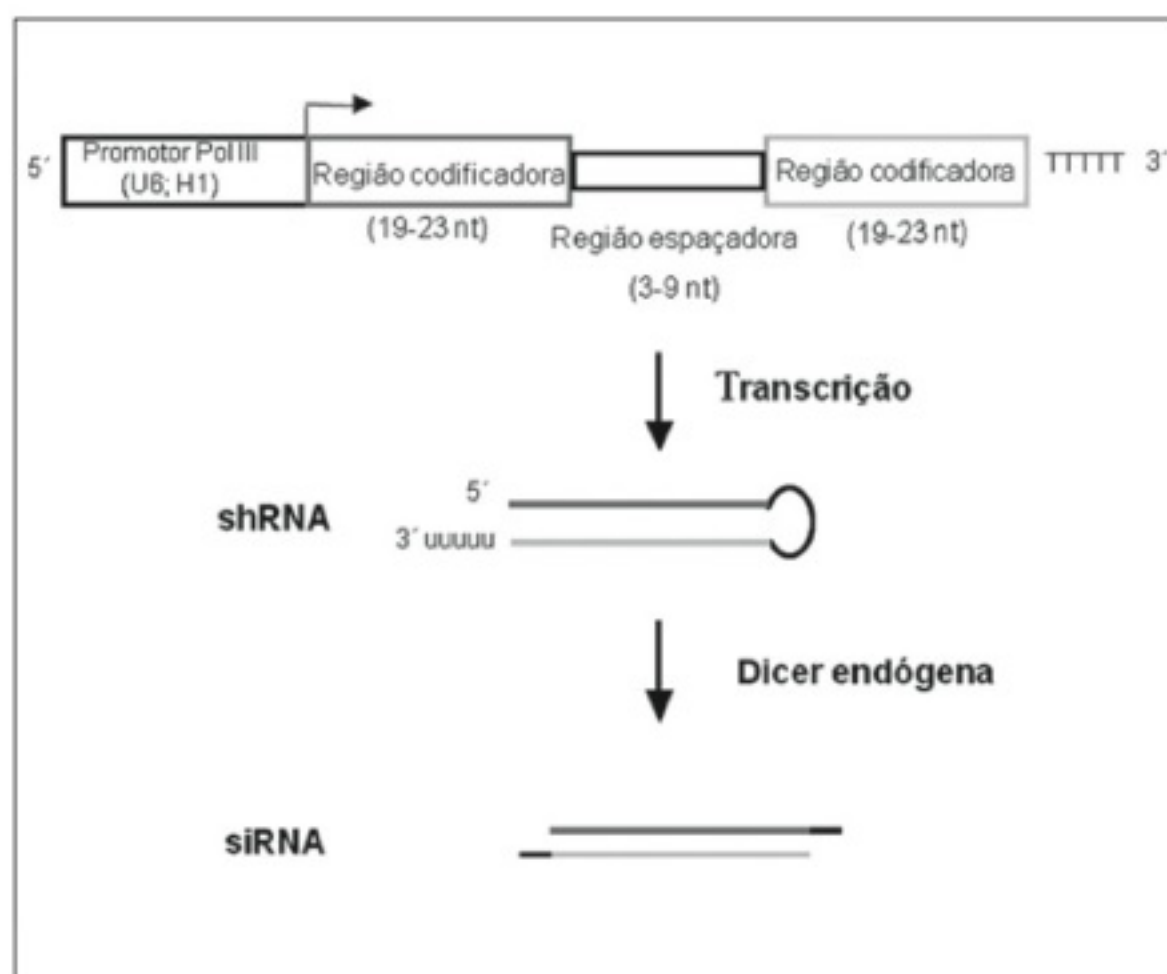


Figura 14.2 – Esquema da região codificadora de shRNAs. Estas possuem cerca de 50 nucleotídeos e são constituídos de duas pequenas sequências complementares invertidas, espaçadas por uma região que pode variar de 3 a 9 nucleotídeos (Shi, 2003), formando um RNA em forma de grampo. Os shRNAs serão processados pela Dicer endógena formando os siRNAs. A repetição de 5 Ts no final da construção indica a terminação transcricional reconhecida pela RNA Pol III.

Pontos Principais para Identificar e Desenhar siRNA

- Deve conter 19 a 23 nucleotídeos.
- Distar de 100 a 200 bases do primeiro AUG (opcional).
- Conter 30-52% de nucleotídeos G/C.
- Pelo menos 3 A/Us na posição 15-19 (fita *sense*).
- Ausência de repetições internas.
- A nas posições 3, 19 (fita *sense*).
- U na posição 10 (fita *sense*).
- G/C não podem ocupar a posição 19 (fita *sense*).
- G não pode ocupar a posição 13 (fita *sense*).
- BLAST: ≤ 15 nt com outros RNAs.
- Iniciar com A (H1) ou G (U6) (para construções em vetores).
- Iniciar com AA (para siRNAs sintético – opcional).

Validando um Alvo

Acima foram descritas as maneiras de se identificar uma boa região-alvo. Como foi visto, uma das maiores dificuldades da utilização do PTGS é o acesso do siRNA a esta região. Dessa forma, para garantir a inativação gênica é aconselhável que se selecione 3 ou 4 regiões-alvo, as quais devem ser validadas em cultura de células. As linhagens mais utilizadas para esse fim, em humanos, são: a 293 (células embrionárias de rim transformadas) e a HeLa (células oriundas de tumor cervical). Sua utilização não é obrigatória, entretanto, por se tratarem de células transformadas, essas são de fácil manuseio em cultura e permitem a seleção do melhor siRNA com maior velocidade. Uma vez definido o melhor siRNA, esse poderá ser empregado no sistema celular de interesse, ou mesmo *in vivo*.

Identificando o Melhor Método para seu Experimento

siRNAs Sintéticos

A utilização de siRNAs sintéticos (Fig. 14.3) não requer muito trabalho na bancada, já que, após sua dedução, os siRNAs são sintetizados em empresa especializada e a única tarefa a ser realizada é introduzir esses pequenos RNAs na linhagem de células adequada para seu estudo. Assim, essa é uma metodologia bastante rápida para definir o melhor siRNA, no entanto, é cara e, por tratar-se da transfecção de RNAs, sua manipulação

requer muitos cuidados para não haver degradação. É apropriada para experimentos que necessitam de grandes quantidades de siRNA para a inativação gênica em experimentos de curta duração.

Além do exemplo descrito na figura 14.3, outro modelo de siRNAs sintéticos foi desenvolvido. Durante a investigação da indução de resposta interferon, pode-se observar que siRNAs de 25-27 nucleotídeos de comprimento pareciam ser mais eficientes do que os de 21 nt para a mesma região-alvo, sem apresentarem a resposta ao interferon (Kim et al., 2004).

O modo de ação proposto para estes siRNAs longos, nomeados dsiRNAs (Dicer-substrate siRNAs), descreve que esta forma mais longa de siRNA pode ser reconhecida e clivada pela Dicer, aumentando a eficiência de incorporação do siRNA no complexo RISC. De fato, foi observado um aumento na eficiência da inativação gênica permitindo a utilização de concentrações menores de RNAs interferentes, além de promover um silenciamento por tempo prolongado (Kim et al., 2005; Siolas et al., 2005). Um problema que pode surgir ao usar essa metodologia é que a Dicer pode gerar vários siRNAs a partir de dsiRNAs, com diferentes eficiências na inativação gênica. Para superar este problema, pequenas alterações na sequência de nucleotídeos dos dsiRNAs podem direcionar a clivagem pela Dicer em sítio específico, gerando sempre o mesmo siRNA (Amarzguioui et al., 2005).

Transcrição *In Vitro*

Transcrição *In Vitro* de Sequência Específica

Esta metodologia é bastante semelhante à de siRNAs sintéticos, uma vez que nela também ocorre a

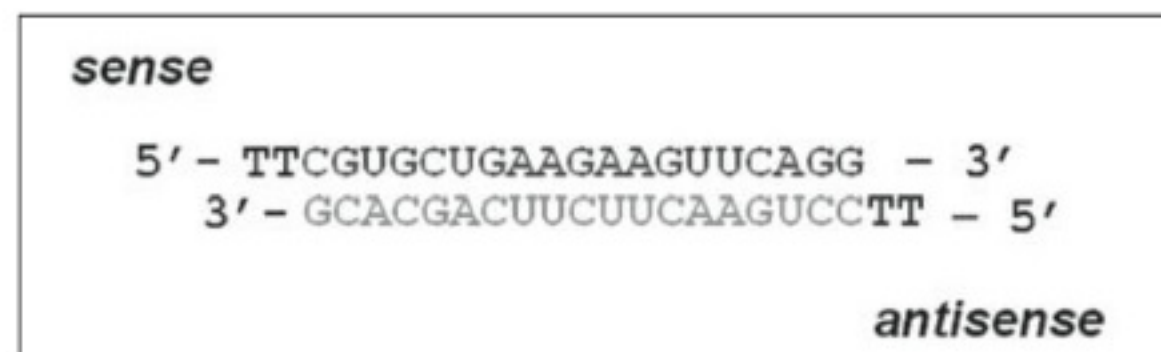


Figura 14.3 – Exemplo de siRNAs sintéticos para cGFP (*enhanced green fluorescent protein*) (Sorensen et al., 2003). Note que as extremidades 3'-TT apresentam-se em simples-fita, pois parecem importantes para que sejam reconhecidas pelo complexo RISC (Josua-Tor, 2004). As extremidades TT estão substituindo as extremidades UU, pois além de terem um custo menor na síntese do RNA, podem protegê-lo da ação de nucleases. Outros modelos também podem ser seguidos, como o de Elbashir et al. (2002): 5'AA(N19)UU.

introdução direta dos siRNAs nas células, apropriada para experimentos de curta duração. Entretanto, esta metodologia tem a vantagem de ser menos custosa.

Disponível em *kits* (exemplo: Silencer™ siRNA Construction kit – Ambion), este método (Fig. 14.4) baseia-se na produção de siRNAs utilizando-se de 2 oligonucleotídeos (*sense* e *antisense*) previamente deduzidos a partir da região-alvo e sintetizados contendo 8 nucleotídeos da região promotora T7 em suas extremidades 5'. Estes nucleotídeos serão hibridizados com *primer* fornecido pelo *kit* que, por sua vez, possui a região promotora T7 completa. Por meio da ação da enzima Klenow DNA polimerase haverá formação de duplas-fitas de DNA (dsDNAs), utilizando como molde os oligonucleotídeos. As dsDNAs (*sense* e *antisense*) formadas terão em suas extremidades 5' a região promotora T7, podendo ser transcritas *in vitro* pela T7 RNA polimerase. Uma vez que os RNAs formados são complementares, esses podem ser hibridizados e transfectados nas células.

As desvantagens desta metodologia são a baixa quantidade de siRNAs produzidos e a já mencionada transfecção de RNAs, embora ela seja ótima para a identificação da melhor região-alvo.

Pool de siRNAs

Uma outra maneira de garantir a eficiência da inativação gênica é a produção de siRNAs contendo diferentes sequências para atingir o mesmo RNA-alvo. Esta produção também é obtida por meio da transcrição *in vitro*, entretanto, diferentemente da metodologia descrita acima, os siRNAs são formados a partir de um fragmento de 200 a 1.000 pb do cDNA do gene de interesse. O princípio da transcrição *in vitro* é o mesmo, porém, neste caso, o cDNA molde é construído de forma a possuir a região promotora T7 em cada uma de suas extremidades (3' e 5'), o que permite que este cDNA seja transcrito em ambas as direções, promovendo a formação das dsRNAs (Fig. 14.5). Estas sofrerão a clivagem pela Dicer, produzindo diversos fragmentos de siRNAs diferentes. A utilização desta metodologia torna desnecessária a escolha de uma região-alvo e permite que o produto gênico seja inativado rapidamente. Contudo, ela é delicada, pois, como dito anteriormente, requer manipulação com RNA, que pode ser degradado durante o processo. Da mesma maneira que as outras metodologias que envolvem a transferência direta de siRNAs, esta não é adequada para experimentos de longa duração e está disponível em *kits* fornecidos por diversas companhias.

Transcrição *In Vivo*

Vetores de Expressão de shRNAs

Ao contrário das técnicas de transcrição *in vitro*, a metodologia descrita neste tópico está baseada na introdução de plasmídeos que irão direcionar a transcrição de shRNAs dentro da célula. Estes shRNAs possuem cerca de 50 nucleotídeos e são constituídos de duas pequenas sequências complementares invertidas, espaçadas por uma região que pode variar de 3 a 9 nucleotídeos (Shi, 2003), apresentando uma conformação de grampo. Utilizando a maquinaria da própria célula, estes shRNAs serão processados pela Dicer endógena formando os siRNAs (ver Fig. 14.2).

As regiões promotoras mais utilizadas para a construção de plasmídeos com código para shRNAs são as que direcionam a transcrição de pequenos RNAs nucleares (small nuclear RNAs – snRNAs), como U6 e H1 (Tuschl, 2002). Estes promotores são constitutivamente ativos em células de mamíferos e promovem a transcrição através da RNA polimerase III (Pol III) (Montgomery e Dietz, 1997); esta inicia a transcrição a partir de um único nucleotídeo específico, termina a transcrição quando encontra um grupo de 4 ou 5 timidinas e é capaz de produzir uma quantidade razoável de RNA. Por estas características, estes promotores são utilizados para facilitar o processamento dos shRNAs pela Dicer, onde eles não devem possuir capuz na extremidade 5' e sinal de poliadenilação na extremidade 3'. Por isso, a utilização destes promotores é bastante adequada para a produção de shRNAs.

Esta metodologia pode ser adquirida em *kits* comerciais ou ser desenvolvida em laboratório, uma vez possuindo o plasmídeo adequado. A construção destes plasmídeos será melhor descrita no exemplo dado neste capítulo. Ela é apropriada para estudos de média duração, pois os plasmídeos não se integram no genoma hospedeiro, podendo ser perdidos durante as divisões celulares. Promovendo, assim, uma expressão transiente. Todavia, esta metodologia permite a inativação gênica por um tempo maior do que as que utilizam entrega direta de siRNAs que, para obterem o mesmo efeito teriam que ser oferecidos constantemente à célula. Outra vantagem é a obtenção de clones celulares isolados. A dificuldade desta metodologia, por outro lado, é o tempo despendido para a construção dos plasmídeos, já que é uma tarefa trabalhosa e, como foi visto, são necessárias pelo menos três construções por RNA-alvo.

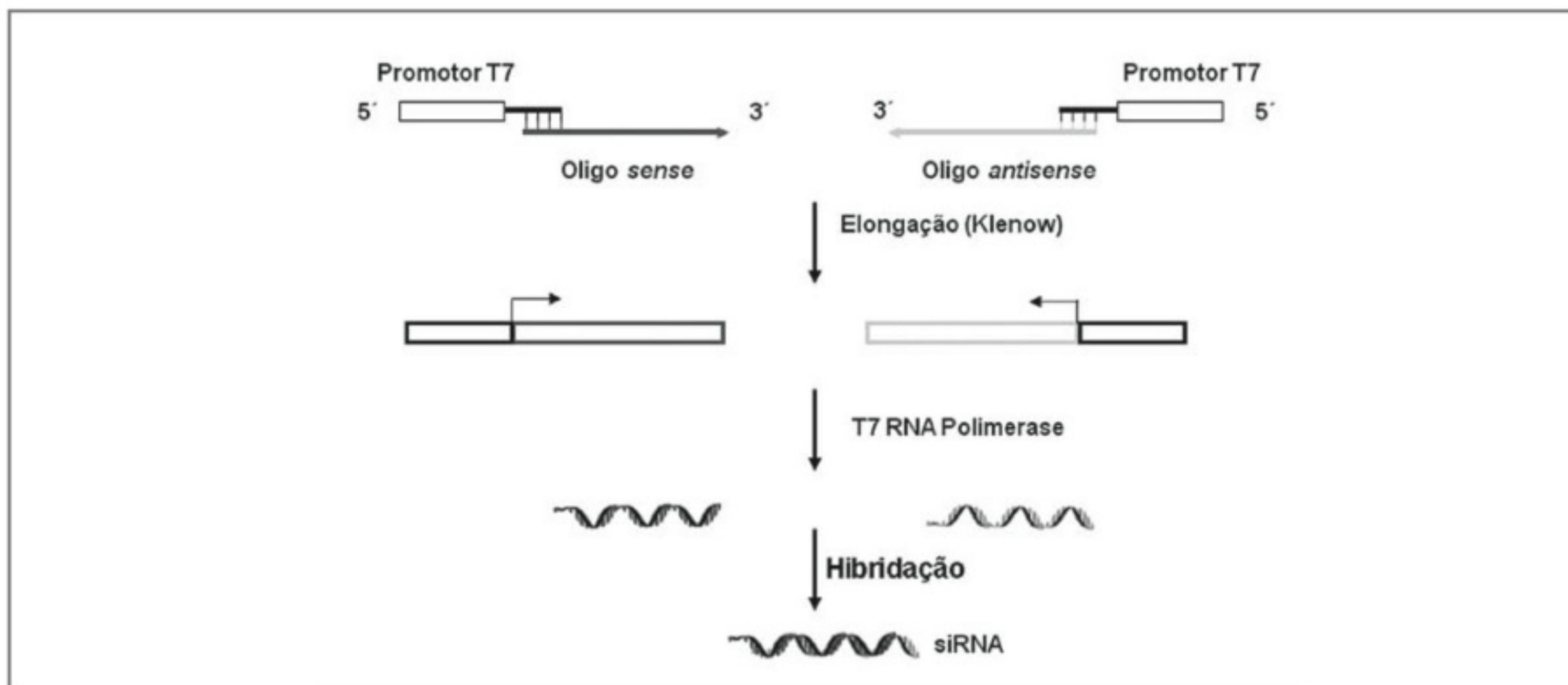


Figura 14.4 – Método de produção *in vitro* de sequência específica de siRNAs. Após a inclusão da região promotora T7 nas extremidades 5' de oligonucleotídeos complementares (*sense* e *antisense*), por meio da clonagem pela Klenow DNA polimerase, é possível a formação de cassetes de expressão para a transcrição *in vitro*. Esta é realizada pela ação da T7 RNA polimerase. A hibridização por complementaridade dos RNAs sintetizados formam os siRNAs.

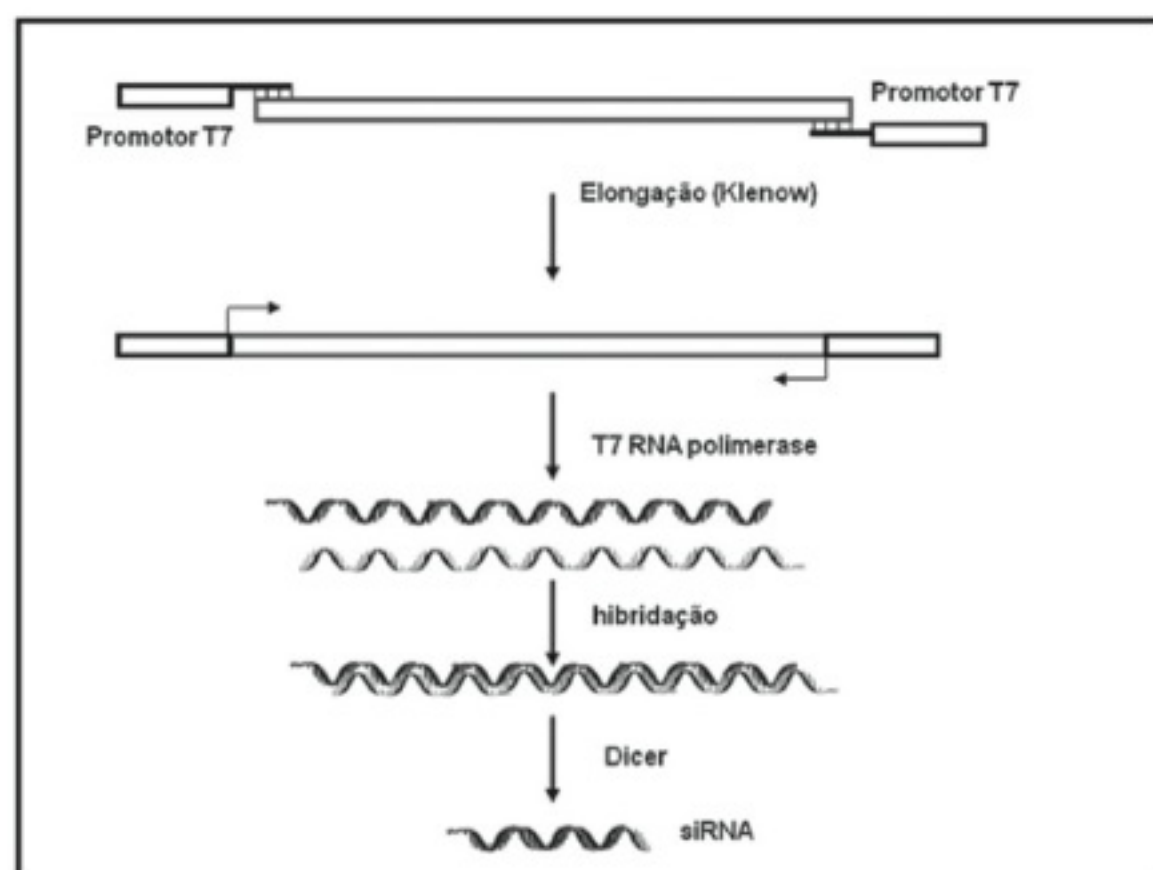


Figura 14.5 – Método de produção *in vitro* de diferentes sequências de siRNAs. Estes são formados a partir da transcrição do cDNA do gene de interesse. Para que ocorra a transcrição *in vitro* deste fragmento é necessária a inclusão de regiões promotoras T7 em cada uma das extremidades do cDNA escolhido, para que este possa ser transcrito em ambas as direções, promovendo a formação das dsRNAs. Isto pode ser obtido através da utilização de *primers* que possuam em suas sequências uma região específica para a amplificação pela reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR) do fragmento desejado em sua porção 3', e outra contendo a região promotora T7, na sua porção 5'. O fragmento formado após a reação poderá ser transcrito *in vitro* para a formação de dsRNAs longas, que serão clivadas pela Dicer formando os diferentes fragmentos de siRNAs.

Cassetes de Expressão

Dentre as metodologias que envolvem a expressão de shRNAs, os cassetes de expressão são construídos mais rapidamente, pois podem ser obtidos por meio de duas ou três reações de amplificação por meio da técnica de PCR, mantendo a mesma estrutura que a encontrada nos plasmídeos: região promotora + shRNA (Fig. 14.6). Esta metodologia foi inicialmente desenvolvida por Castanotto et al. (2002) e hoje já existem *kits* desenvolvidos para a produção destes cassetes (Silencer™ Express - Ambion) que são utilizados diretamente na transfecção de células em cultura, sem a necessidade de serem previamente clonados em plasmídeos.

É um ótimo método para a identificação do siRNA, mais eficaz na inativação gênica, pois tem um custo menor que os sintéticos e é mais rápido de construir que os vetores de expressão. Além disso, os cassetes são de fácil transfecção, pois têm tamanhos reduzidos. Esta metodologia pode servir também para a identificação da melhor região promotora para a expressão dos shRNAs, uma vez que os *kits* comerciais oferecem as duas regiões promotoras mais empregadas, U6 e H1. Apesar de não permitir a obtenção de clones celulares isolados, uma vez determinado o melhor cassete, este pode ser posteriormente clonado em plasmídeo adequado, já que os *primers* são desenhados de forma a conter sítios de restrição em suas extremidades 5' e 3'.

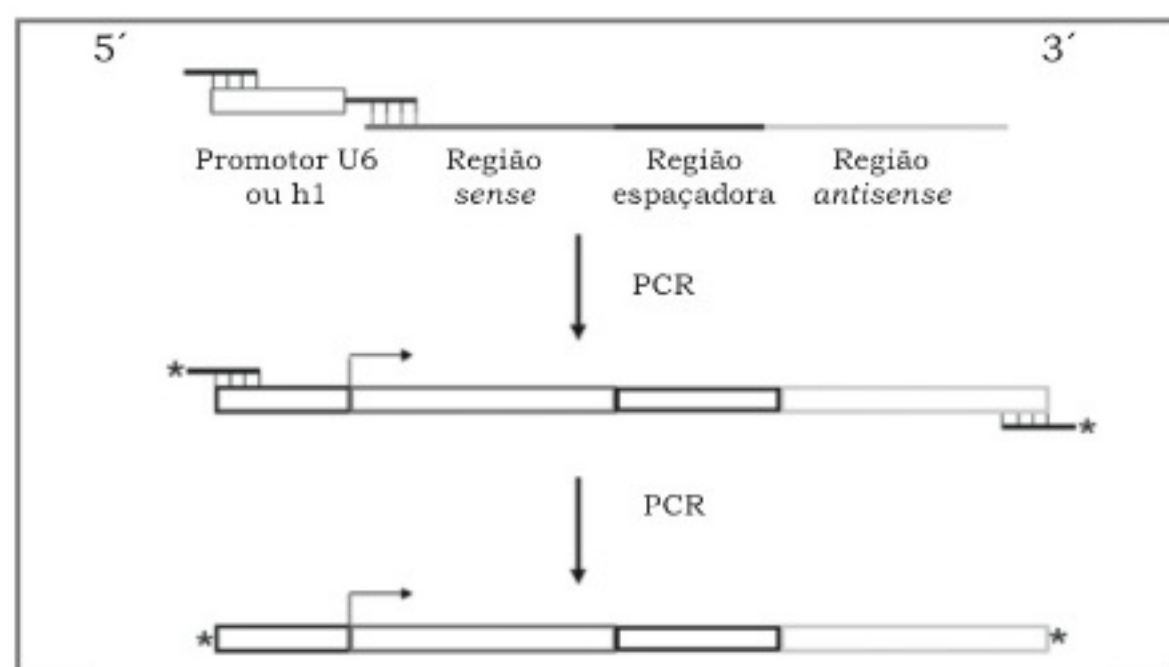


Figura 14.6 – A região promotora, U6 ou H1, é amplificada em uma reação da PCR, o *primer* que irá hibridar com a porção 3' do elemento promotor possui a sequência do shRNA de interesse. Assim, nesta etapa ocorre a formação do cassete precursor de expressão de shRNAs. Uma nova amplificação é realizada para a obtenção de uma massa maior do produto a ser utilizado na transfecção celular. Nesta nova amplificação, os *primers* utilizados possuem extremidades 5' modificadas (*) que garantem proteção às extremidades do cassete, oferecendo maior estabilidade contra DNases no interior da célula.

Além das metodologias descritas aqui, recentemente dois grupos de pesquisadores independentes desenvolveram uma nova abordagem, no qual combinaram duas metodologias em uma única: *Pools de siRNAs* inseridos em plasmídeos, formando bibliotecas de shRNAs (Shirane et al., 2004; Sem et al., 2004). Estas estão sendo utilizadas para a identificação da função de genes já descritos e de novos genes por meio da genética reversa (Cullen e Arndt, 2005).

Exemplo de Construção de Plasmídeos Contendo Código para shRNA

O objetivo deste capítulo é capacitar o leitor a escolher o melhor método de inativação do gene de interesse por RNAi e ajudá-lo a utilizá-lo. Nesse sentido, será utilizado como exemplo um modelo de construção de plasmídeos de expressão de shRNAs para a inativação do gene Gfp (*green fluorescent protein*), que é oriundo de uma espécie de água-viva (*Aequoria victoria*), expressa uma proteína bioluminescente e é amplamente utilizado como repórter tanto *in vitro* como *in vivo*. Regiões-alvos reais utilizadas no silenciamento gênico obtido por outras metodologia (Sorensen et al., 2003; Tisconia et al., 2003; Mousses et al., 2003; Leirdal e Sioud, 2002 (Fig. 14.6), serão empregadas apenas como referência para a construção do siGFP (siRNA-GFP). Este, por sua vez, pode funcionar tanto como um controle positi-

vo da RNAi, demonstrando que o sistema celular utilizado é capaz de desencadear a inativação do gene-alvo com especificidade, quanto ser utilizado como controle negativo, demonstrando que não interfere na expressão de outros genes.

Equipamentos

- Banho refrigerado (16°C).
- Cuba e fonte para eletroforese.
- Fluxo laminar.
- Espectrofotômetro.
- Incubadora com injeção de CO₂.
- Material plástico estéril para cultura de células.
- Microscópio de luz.
- Pipetador automático.
- Pipetas para os volumes: 20 µL, 200 µL, 1000 µL.
- Ponteiras para pipetas.
- Refrigerador.
- Termociclador.

Reagentes e Produtos

- Agarose.
- Bactérias competentes.
- Brometo de etídeo.
- Cilindro de a CO₂ a 5%.
- Enzimas de restrição *Bbs* I e *Xho* I.
- Linhagem celular (293 ou HeLa).
- Lipofectamina.
- Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM).
- Oligonucleotídeos previamente deduzidos (ver texto).
- pEGFP-N3.
- Plasmídeo contendo a região promotora U6.
- *Primers*:
 - T3 5'- AATTAACCCTCACTAAAggg -3'.
 - T7 5'- gTAATACgACTCACTATAgggC -3'.
- Soro fetal bovino.
- T4 DNA ligase.

Metodologias necessárias

- Neste capítulo não serão descritas as seguintes metodologias citadas:
Produção de bactérias competentes (Sambrook et al., 1989).
Transformação bacteriana (Sambrook et al., 1989).
Sequenciamento automático.
Preparação em pequena escala – *mini-prep* (Sambrook et al., 1989); ou protocolo do fornecedor.
Preparação em média escala – *midi-prep* (Sambrook et al., 1989); ou protocolo do fornecedor.
- Opções para verificação da expressão do gene de interesse:
Citometria de fluxo (Capítulo 25).
Northern blotting (Capítulo 6).
PCR em tempo real (Capítulo 10).
Western blotting (Capítulo 23).

Equipamentos, Produtos, Reagentes e Soluções Necessários para as Metodologias não Descritas

- Ampicilina.
- Neomicina.
- Centrífugas.
- Cloreto de cálcio.
- Estufa com agitação para cultura de bactérias.
- Glicerol.
- *Kit* para o sequenciamento automático.
- *Kit* para *mini-prep* e *midi-prep*.
- Meio de cultura para bactérias Luria-Bertani (LB).
- Meio de cultura Luria-Bertani com ágar (LB-Ágar).
- Sequenciador automático.
- Vidraria e material plástico estéril para cultura de bactérias.
- Vórtice.

Deduzindo Oligos

Utilizando a sequência do cDNA do gene de interesse, como por exemplo o gene eGFP (*enhanced GFP*) (Fig. 14.7) contido no plasmídeo pEGFP-N3, siga os pontos principais para identificar o siRNA. Note que os três exemplos citados neste capítulo são alvos que comprovadamente inativam o GFP, apesar de distarem em

até 940 bases do primeiro ATG (Sorensen et al., 2003; Tisconia, 2003; Mousses, 2003; Leirdal e Sioud, 2002).

A partir de cada uma destas sequências, dois oligonucleotídeos complementares devem ser desenhados e sintetizados. Quando hibridizados formarão a dupla-fita com código para shRNAs (Fig. 14.8). As extremidades 5' de cada oligonucleotídeo devem conter os nucleotídeos necessários para a ligação posterior nos sítios de restrição do plasmídeo. Para clonar os oligonucleotídeos com código para shRNA no plasmídeo pBS/hU6-1 (Qin et al., 2003 – Fig. 14.9), derivado do plasmídeo pBlueScript SKII (Stratagene), devem ser utilizados os sítios de restrição *Bbs* I e *Xho* I. Como exemplo, os oligonucleotídeos da região 1 (Fig. 14.7) (Sorensen et al., 2003) foram deduzidos e estão descritos na figura 14.8. Em *itálico*, estão destacados os nucleotídeos referentes aos sítios de restrição para clonagem, em caixa alta e circundado está destacado o nucleotídeo de início da transcrição. Note que o plasmídeo possui o promotor U6 e, portanto, o primeiro nucleotídeo é um **G**. As regiões sublinhadas são as regiões espaçadoras, que separam as regiões complementares que formarão o shRNA (ver Fig. 14.2). Os **Ts** (e respectivos **As** complementares) são as regiões de sinalização de término de transcrição. E, finalmente, em **cinza escuro e claro** as regiões *sense* e *antisense* que formarão a dsRNA após a transcrição, respectivamente.

Hibridação dos Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos deduzidos e sintetizados devem ser hibridizados utilizando-se 50 ng de cada um dos oligonucleotídeos do par (*sense* e *antisense*), em tampão de anelamento (Tabela 14.1), com volume final de 50 µL. A mistura deve ser incubada a 88°C por 2 min, 65°C por 10 min e 37°C por 10 min (utilizar termociclador).

Ligação

Para a clonagem dos oligonucleotídeos previamente anelados, o plasmídeo pBS-hU6-1 (Qin et al., 2003) (Fig. 14.9) deve ser clivado, por meio das enzimas de restrição *Bbs* I e *Xho* I. Assim, a clivagem de 2 µg de plasmídeo é obtida, utilizando-se 5 unidades de cada enzima por reação com volume final de 30 µL, com o tampão indicado pelo fornecedor. A amostra deve ser aplicada em gel de agarose a 0,7%, TAE concentrado 1× (Tabela 14.1), 0,5 µg/mL de brometo de etídio e submetida à eletroforese a 50 Volts por 30 min para a verificação da clivagem. Como resultado, pode-se observar a presença de um único fragmento de 3,2 kb, demonstrando a linearização do plasmídeo.


```

tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg 61
cgttacataa cttacggtaa (ATG)ccccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgccatt 121
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca 181
atgggtggag tatttacggt aaactgcccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 241
aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta 301
catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac 361
catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg 421
atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg 481
ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggag gtaggcgtgt 541
acggtgggag gtctatataa gcagagctgg ttagtgaac cgtcagatcc gctagcgcta 601
ccggactcag atctcgagct caagcttcga attctgcagt cgacggatcc gcgggcccgg 661
gatccatcgc caccatggtg agcaaggcg aggagctgtt caccggggtg gtgcccattc 721
tggctgagct ggacggcgac gtaaacggcc acaagttcag cgtgtccggc gagggcgagg 781
gcatgcccac ctacgGCAAG CTGACCCTGA AGTTCAT1ctg caccacggc aagctgccc 841
tgccctggcc caccctcgtg accacctga ctaacggcgt gcagtgttc agccgtacc 901
ccgaccacat gaagcaGCAC GACTTCTTCA AGTCC2gcat gccgaaggc tacgtccaGG 961
AGCGCACCAT CTTCTTC3aag gacgacggca actacaagac ccgcgcgag gtgaagttcg 1021
agggcgacac cctggtgaac cgcacgagc tgaaggcat cgacttcaag gaggacggca 1081
acatcctggg gcacaagctg gactacaact acaacagcca caacgtctat ...

```

Figura 14.7 – Sequência parcial do eGFP utilizada para a identificação de alvos para a atuação de siRNAs. ATG = códon de início da tradução; Região 1 = sequência-alvo utilizada por Tisconia et al. (2003) na construção de lentivírus e Mousses et al. (2003) na construção de siRNA sintéticos; Região 2 = sequência-alvo utilizada por Sorensen et al. (2003) na construção de siRNA sintéticos e Leirdal e Sioud (2002) na construção de siRNAs por transcrição *in vitro*; Região 3 = sequência-alvo utilizada também por Leirdal e Sioud (2002) na construção de siRNAs por transcrição *in vitro*. Estas sequências utilizadas para a produção de siRNAs por diferentes métodos serão úteis para exemplificar a construção de plasmídeos que expressam shRNAs.

Tabela 14.1 – Soluções utilizadas nas etapas de hibridação dos Oligonucleotídeos; ligação e experimentos em cultura de linhagens celulares humanas.

Soluções	Preparo	Armazenamento
Tampão Tris-ácido-acético (TAE) – concentrado 1x	40 mM tris-acetato 1 mM EDTA	Temperatura ambiente
tripsina-EDTA	Tripsina a 0,5% EDTA a 0,2% NaCl a 0,71% KCl a 0,04% Glicose a 0,1% NHCO ₃ a 0,0035% Vermelho de fenol a 0,001%	Geladeira (4°C)
Tampão de anelamento	100 mM tris (pH 8,0) 50 mM MgCl ₂	Freezer (-20°C)
Tampão fosfato salina sem cálcio e sem magnésio (PBS)	NaCl a 0,82 % KCl a 0,02 % KH ₂ PO ₄ a 0,02 % Na ₂ HPO ₄ a 0,115 %	Geladeira (4°C)
DMEM com soro a 10%	Dissolver 13,5 g de meio em 800 mL de água ultrapura; depois de dissolvido adicionar 1,2 g de NaHCO ₃ e os antibióticos 25 mg de ampicilina (25 mg/L) e 100 mg de sulfato de estreptomicina 100 mg/L. Ajustar o pH = 7,4 e completar o volume para 900 mL. Filtrar em membrana com poros de 0,22 µm e adicionar 100 mL de soro fetal bovino estéril	Geladeira (4°C)



Figura 14.8 – Dedução de oligonucleotídeos complementares que, quando hibridizados, formam a dupla-fita com código para o shRNA desejado.

Uma vez digerido, utilize 5 a 10 ng do plasmídeo linearizado para a ligação com 2 ng dos oligonucleotídeos hibridizados por meio da ação de 0,5 unidade da enzima T4 DNA ligase e tampão indicado pelo fornecedor, com volume final de 10 µL. A reação deve ser mantida a 16°C/1-12 h (utilizar banho refrigerado ou termociclador).

As ligações obtidas devem ser utilizadas na transformação de bactérias competentes e plaqueadas em LB-ágar contendo 50 µg/mL de ampicilina. Uma vez que o plasmídeo pBS-hU6-1 possui gene que confere resistência à ampicilina, as colônias obtidas na transformação serão aquelas que receberam o plasmídeo ligado. Os plasmídeos construídos, pBS/hU6-1siGFP devem ser recuperados do interior das bactérias através de preparação em pequena escala (minipreparação, do inglês *mini-prep*), para posterior análise das construções.

Verificação da Construção

Sequenciamento dos Plasmídeos

As construções obtidas por *mini-prep* devem ser sequenciadas com os *primers* T3 e T7 (*fornecido por diversas empresas*), que se encontram a 5' e 3', respectivamente, do sítio de clonagem múltipla do plasmídeo pBS-hU6-1, para a verificação da integridade da construção. A utilização de 0,5 a 1,8 µg de cada DNA plasmídeo é suficiente para sequenciamentos automáticos, seguindo as especificações do fabricante. Quanto melhor a qualidade do DNA, mais fácil de se obter um bom sequenciamento, portanto, se possível, utilize *kit* comercial de *mini-prep*.

Uma vez obtida a construção desejada, esta deve ser produzida em média escala (*midi-prep*) para posterior transfeção na linhagem de células.

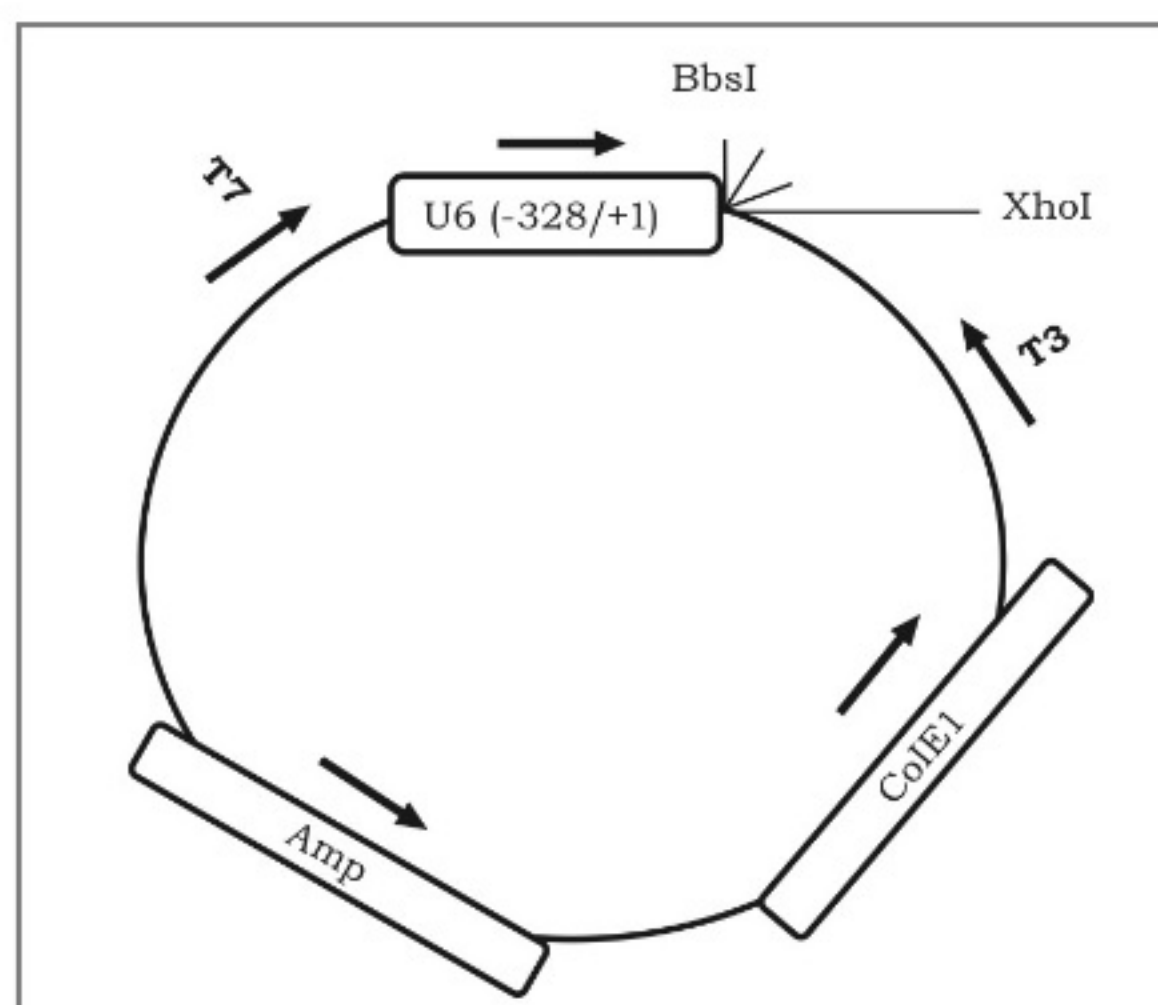


Figura 14.9 – Representação esquemática do plasmídeo pBS/hU6-1 (Qin et al., 2003). Amp = gene que confere resistência à ampicilina em células procariontes; ColE1 = origem de replicação; U6(-328/+1) = região promotora do gene U6 humano (RNA Pol III); T3/T7 = *primers* (*Stratagene*) que flanqueiam o sítio de múltipla clonagem.

Experimentos em Cultura de Linhagens Celulares Humanas

Manuseio das Linhagens

Como dito anteriormente, as linhagens 293 e HeLa vêm sendo amplamente utilizadas para a validação de siRNAs e serão utilizadas como modelo.

Estas células podem ser cultivadas em meio de cultura DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (Tabela 14.1) em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

O processo de tripsinização consiste em lavar duas vezes as células com 3 mL de PBSA e acrescentar a elas 0,25% de tripsina-EDTA (Tabela 14.1) nas seguintes quantidades: 0,3 mL – placas de 35 e 60 mm de diâmetro; 0,5 mL – placas de 100 mm de diâmetro. Após as células estarem em suspensão, adiciona-se meio de cultura contendo soro para a inibição da ação da tripsina e para a homogeneização.

Transfecção através de Lipossomos

Semelhante à transfecção com ODN-lipofectina, descrita no Capítulo 13, células (293 ou HeLa) com 80% de confluência, em placas de 35 mm de diâmetro, devem ser transfectadas com 2 µg de DNA plasmideal. Uma vez que o GFP não é um gene endógeno, as células devem ser cotransfectadas com pEGFP-N3 (4,7 kb) (Clontech) que contém um gene que confere resistência à neomicina, juntamente com o pBS-hU6-1siGFP (3,2 kb), em uma proporção 1:5 (Tisconia et al., 2003). Para manter esta proporção, é necessário levar em conta os pesos moleculares de cada um dos plasmídeos. Assim, deve-se usar 3,4 µg de pBS/hU6-1siGFP para cada 1 µg de pEGFP-N3. O DNA é acrescido de meio sem soro fetal bovino, em um volume final de 100 µL. A esta mistura adiciona-se 10 µg de lipofectamina, previamente diluídos em meio também sem soro, em um volume final de 100 µL. Trabalhe sempre com duplicatas e também fazer os controles: células não transfectadas e transfectadas apenas com pEGFP-N3.

Após 30 a 45 minutos em temperatura ambiente, os 200 µL da mistura DNA/lipossomo devem ser acrescidos de 0,6 mL de meio de cultura sem soro e colocados em contato com as células. Esta solução deve ser substituída após 5 horas, por meio de cultura com 10% de soro fetal bovino, pois lipossomos sintéticos são tóxicos para as células.

Após 24 horas, as células transfectadas, bem como as controles, devem ser expandidas para placas de 10 cm de diâmetro com meio DMEM contendo 400 µg/mL de neomicina, para a obtenção de clones e *pools* celulares.

Detecção da Expressão Gênica

A expressão do gene eGFP pode ser avaliada após 24 horas em microscópio de fluorescência (Tisconia et al., 2003). Este é o tempo necessário para a observação da expressão de eGFP nas células controles (transfectadas apenas com pEGFP-N3). Entretanto, se houver coleta de clones celulares, a eficiência da inativação poderá ser mais bem observada após duas semanas, quando os clones já estarão formados após a seleção

com neomicina. Já a quantificação da diminuição da expressão pode ser realizada por citometria de fluxo (Capítulo 25), PCR em tempo real (Capítulo 10) ou métodos mais convencionais como *Northern blotting* (Capítulo 6) ou *Western blotting* (Capítulo 23). Com exceção da citometria de fluxo, qualquer que seja o tipo de metodologia empregada, a expressão de um gene controle deve ser utilizada para normalizar a expressão entre as amostras (exemplo: GAPDH).

A escolha do método de avaliação da expressão é bastante importante e deve levar em conta aspectos peculiares da expressão do gene a ser inativado, como, por exemplo, o tipo de tecido em que é expresso, se a expressão do gene é temporal ou induzida sob certas circunstâncias. Por exemplo, a verificação da expressão de genes envolvidos com ciclo celular pode necessitar de padronização prévia de sincronização do crescimento das células utilizadas como controle *versus* células contendo siRNA, para uma comparação fidedigna. Nestes casos, também é necessária a escolha de gene normalizador que não está envolvido com o ciclo celular (exemplo: β -actina).

Evitando e Resolvendo Problemas em seu Experimento

1ª) Durante a construção do plasmídeo de expressão de shRNA é muito comum encontrar falso-positivos, devido a digestões parciais do plasmídeo. Se este for clivado apenas com uma das enzimas, quando for realizada a reação de ligação haverá ligação de plasmídeos sem inserto. Portanto, faça controles das digestões, transformando bactérias com plasmídeos clivados com uma ou com outra enzima. Se as bactérias crescerem nas placas semeadas, é sinal de que a digestão foi parcial.

2ª) Caso o modelo experimental exija a inativação gênica em cultura de células primárias, ou em modelo animal, recomendam-se utilizar células transformadas (como as citadas neste capítulo) para a identificação do melhor siRNA. Após esta identificação, o siRNA escolhido pode ser transferido para um sistema de entrega mais eficiente, como, por exemplo, partículas virais.

3ª) Na inativação de genes endógenos é importante caracterizar a expressão do gene a ser inativado no modelo experimental, pois muitos genes possuem expressão diferencial entre os tecidos. Se a linhagem celular utilizada para a escolha do siRNA efetivo não for a mesma que será realmente utilizada no estudo, é apropriado fazer uma análise comparativa da expressão do RNA-alvo entre os diferentes tipos celulares a serem estudados.

Referências

- Amarzguioui, M.; Rossi, J.J.; Kim, D.; Approaches for chemically synthesized siRNA and vector-mediated RNAi. *FEBS Lett.*, 579(26):5974-5981, 2005.
- Bernstein, E.; Kim, S.Y.; Carmell, M.A.; Murchison, E.P.; Alcorn, H.; Li, M.Z.; Mills A.A.; Elledge, S.J.; Anderson, K.V.; Hannon, G.J. Dicer is essential for mouse development. *Nat. Genet.*, 35(3):287, 2003.
- Barton, G.M.; Medzhitov, R. Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(23):14 943-945, 2002.
- Brummelkamp, T.R.; Bernards, R.; Agami, R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 296(5567): 550-553, 2002.
- Castanotto, D.; Li, H.; Rossi, J.J. Functional siRNA expression from transfected PCR products. *RNA*, 8(11):1454-1460, 2002.
- Chuang, C.F.; Meyerowitz, E.M. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(9):4985-4990, 2000.
- Cullen, L.M.; Arndt, G.M. Genome-wide screening for gene function using RNAi in mammalian cells. *Immunol. Cell Biol.*, 83(3):217-223, 2005.
- Elbashir, S.M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411(6836):494-498, 2001.
- Elbashir, S.M.; Harborth, J.; Weber, K.; Tuschl, T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*, 26(2):199-213, 2002.
- Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M.K.; Kostas, S.A.; Driver, S.E.; Mello, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669):806-811, 1998.
- Hammond, S.M. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett. (Lett. a observiatura de letras)*, 579(26):5822-5829, 2005.
- Hannon, G.J. RNA interference. *Nature*, 418(6894):244-251, 2002.
- Hutvagner, G.; Zamore, P.D. RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 12(2):225-232, 2002.
- Joshua-Tor, L. siRNAs at RISC. *Structure*, 12(7):1120-1122, 2004.
- Kaufman, R. J. Double-stranded RNA-activated protein kinase mediates virus-induced apoptosis: a new role for an old actor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96:11693-11695, 1999.
- Kim, D.H.; Behlke, M.A.; Rose, S.D.; Chang, M.S.; Choi, S.; Rossi J.J.; Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat. Biotechnol.*, 23(2):222-226, 2005.
- McCaffrey, A.P.; Meuse, L.; Pham, T.T.; Conklin, D.S.; Hannon, G.J.; Kay, M.A. RNA interference in adult mice. *Nature*, 418:38-39, 2002.
- McManus, M.T.; Sharp P.A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat. Rev. Genet.* 3(10):737-747, 2002.
- Misquitta, L.; Paterson, B.M. Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(4):1451-1456, 1999.
- Montgomery, M.K.; Xu, S.; Fire, A. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(26):15502-15507, 1998.
- Montgomery, R.A.; Dietz, H.C. Inhibition of fibrillin 1 expression using U1 snRNA as a vehicle for the presentation of antisense targeting sequence. *Hum. Mol. Genet.*, 6(4):519-525, 1997.
- Paul, C.P.; Good, P.D.; Winer, I.; Engelke, D.R. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat. Biotechnol.*, 20(5): 505-508, 2002.
- Qin, X.F.; An, D.S.; Chen, I.S.; Baltimore, D. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(1):183-188, 2003.
- Reynolds, A.; Leake, D.; Boese, Q.; Scaringe, S.; Marshall, W.S.; Khvorova, A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.*, 22(3):326-330, 2004.
- Rubinson, D.A.; Dillon, C.P.; Kwiatkowski, A.V.; Sievers, C.; Yang, L.; Kopinja, J.; Rooney, D.L.; Ihrig, M.; McManus, M.T.; Gertler, F.B.; Scott, M.L.; Van Parijs, L. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat. Genet.*, 33(3):401-406, 2003.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2 nd ed.- New York: Cold Spring Harbor; 1989.vol 1-3.
- Shi Y. Mammalian RNAi for the masses. *Trends Genet.*, 19(1):9-12, 2003.
- Siolas, D.; Lerner, C.; Burchard, J.; Ge, W.; Linsley, P.S; Paddison, P.J; Hannon, G.J; Cleary, M.A. Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat. Biotechnol.*, 23(2):227-231, 2005.
- Sorensen, D.R.; Leirdal, M.; Sioud, M. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J. Mol. Biol.*, 327(4):761-766, 2003.
- Sui, G.; Soohoo, C.; Affar, el B.; Gay, F.; Shi, Y.; Forrester, W.C.; Shi, Y. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(8):5515-5520, 2002.
- Tiscornia, G.; Singer, O.; Ikawa, M.; Verma, I.M. A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vec-

- tors expressing small interfering RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(4):1844-1848, 2003.
- Tuschl, T.; Zamore, P.D.; Lehmann, R.; Bartel, D.P.; Sharp, P.A. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. *Genes Dev.*, 13(24):191-3197, 1999.
- Tuschl, T. Expanding small RNA interference. *Nat. Biotechnol.*, 20(5): 446-448, 2002.
- Wiznerowicz, M.; Trono, D. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J. Virol.*, 77(16):8957-8961, 2003.

15. Análise da Expressão Gênica nas Células e Tecidos: Hibridação *In Situ* Não Radioativa

Fábio Daumas Nunes

Introdução

As técnicas de Hibridação *in situ* permitem a localização de sequências específicas de DNA ou RNA em cromossomos, células ou tecidos, ao contrário dos homogeneizados que apenas informam a presença ou ausência de um ácido nucleico. Essas técnicas são baseadas no princípio de Hibridação que pode ser descrito como a formação de dúplex de bases pareadas, sequência-específicas, a partir de qualquer combinação de fragmentos de ácidos nucleicos, usualmente *in vitro*. Apesar da grande especificidade e ampla aplicabilidade, essa técnica tem estado limitada aos laboratórios de pesquisa. Esse fato provavelmente se deve ao uso de sondas radiativas e alguns problemas associados com sua utilização, bem como ao tempo despendido em algumas técnicas auxiliares para o preparo da sonda. A maioria desses obstáculos é superada com o uso de sondas não radiativas, e seu uso se tornará progressivamente comum com a disponibilização de um maior número de *kits* comerciais. Embora a sensibilidade da Hibridação *in situ* seja menor que outras técnicas como PCR e *Northern blotting*, ela é muito útil na identificação de transcritos de um gene com baixa expressão em um dado tecido, mas com altos níveis de expressão em um tipo de células desse mesmo tecido (Lodish, 2000). Porém, se o mRNA de determinado gene tem baixa expressão pode ser difícil localizá-lo. São vários os métodos nos quais se utiliza Hibridação de ácidos nucleicos (Strachan; Read, 1999): Hibridação *in situ* fluorescente (FISH), *Northern blotting*, *Southern blotting*, Hibridação *in situ* de cromossomos, Hibridação genômica comparativa, entre muitos outros. Recentemente, até métodos para a detecção de microRNA têm sido descritos (Wheeler, 2007). Neste capítulo abordaremos a Hibridação *in situ* utilizando ribossondas, principalmente, além dos vários princípios que cercam essa técnica e que podem ser utilizados em outros métodos.

A tabela 15.1 compara diferentes tipos de sonda, suas vantagens e desvantagens.

Preparo do tecido

Fixação

O material a ser usado deve ser rapidamente fixado depois de colhido para minimizar a atividade de enzimas endógenas e a alteração dos ácidos nucleicos, bem como evitar degradação. No estudo de transcritos de mRNA, esse fato é particularmente importante porque o RNA é muito facilmente degradado. Quando necessário; o tecido deve ser cortado em pedaços menores que 1 cm para uma penetração adequada do fixador e fixação homogênea.

São dois os principais tipos de fixadores utilizados: os aldeídos (por exemplo, paraformaldeído e glutaraldeído) e os precipitadores de proteína (por exemplo, metanol e *bouin*). Os fixadores aldeídos promovem reações cruzadas entre as moléculas e levam a uma boa morfologia, porém a permeabilidade do tecido é reduzida e consequentemente a penetração dos reagentes e da sonda. Os fixadores que precipitam proteínas não reduzem muito a permeabilidade, mas a morfologia pode ser comprometida, bem como a preservação dos ácidos nucleicos. Fixadores aldeídos são também problemáticos para sondas marcadas com substâncias fluorescentes, provocando autofluorescência. Todos esses fatores são dependentes principalmente da concentração e do tempo de fixação.

Permeabilização

É comum o uso de enzimas (por exemplo, proteinase K, pepsina e pronase E) para digerir proteínas e auxiliar a penetração da sonda e reagentes, principalmente quando o tecido é preso com fixadores do tipo aldeído, e mesmo outros reagentes, como o ácido clorí-

Tabela 15.1 – Vantagens e desvantagens das sondas usadas em Hibridação *in situ* (adaptado de Feldman; Meyer; Quenzer, 1997).

Tipo de sonda	Vantagens	Desvantagens
DNA (dupla fita)	Fácil de usar Subclonagem não é necessária Possibilidade de amplificação de sinal Métodos de marcação à escolha Atividade específica alta	Reassociação da solda durante a hibridação diminuindo sua disponibilidade Maior comprimento da sonda necessário com menor penetração tecidual Híbridos menos estáveis que as sondas de RNA
DNA (fita única)	Não é necessária desnaturação Não reassocia durante a hibridação	Complexidade técnica Subclonagem é necessária Híbridos menos estáveis do que sondas de RNA Necessária desnaturação da sonda
RNA	Estabilidade dos híbridos Alta atividade específica Não é necessário desnaturação da sonda Não reassocia Sonda não hibridada pode ser destruída enzimaticamente	Necessário subclonagem Menor penetração tecidual
Oligonucleotídeo	Não é necessário clonagem Estável Boa penetração tecidual (menor tamanho) Não auto-hibrida	Método limitado de marcação Menor atividade específica, portanto menor sensibilidade Depende de sequências publicadas Híbridos menos estáveis

drico (HCl). O procedimento de permeabilização deve ser extensivamente otimizado, especialmente a concentração da enzima, pois depende deste, muitas vezes, a obtenção de um ótimo resultado, principalmente porque as condições de permeabilização vão depender do tipo de tecido, quantidade de colágeno e de célula, entre outros fatores. Devido a esses fatores, o tempo de permeabilização também deve ser otimizado, e sua determinação é muitas vezes empírica, tomando por base um protocolo já existente (ver a seguir).

Síntese e Preparo da Sonda

Quando uma solução aquosa de DNA é aquecida a 100°C ou é exposta a um pH muito alto (pH \geq 13,0), as forças químicas que mantêm os pares de base complementares unidos são rompidas e a dupla hélice rapidamente se dissocia em duas fitas únicas. Este método, denominado desnaturação do DNA, pode ser revertido em um processo chamado Hibridação se as fitas estiverem próximas em condições adequadas. Essa reação de Hibridação pode ocorrer entre duas fitas únicas de qualquer cadeia de ácido nucleico (DNA/DNA, RNA/

RNA, ou RNA/DNA), desde que sua sequência de nucleotídeos seja complementar. Essa reação de Hibridação é muito específica e amplamente usada para localizar e caracterizar sequências específicas de nucleotídeos em moléculas de DNA e RNA.

As moléculas de fita única de ácidos nucleicos utilizados para encontrar sequências complementares são conhecidas como sondas. Estas moléculas, que possuem marcadores químicos ou radiativos, podem variar de 15 a milhares de nucleotídeos de extensão. Reações de Hibridação usando sondas de DNA, por exemplo, são tão sensíveis e específicas que elas podem detectar sequências complementares presentes em concentrações tão baixas quanto uma molécula por célula. É possível determinar quantas cópias de qualquer sequência de DNA estão presentes em uma amostra de DNA em particular. A mesma técnica pode ser utilizada para procurar por genes similares mas não idênticos. Para encontrar um gene de interesse em um organismo cujo genoma ainda não tenha sido sequenciado, por exemplo, uma pequena sequência do gene conhecido pode ser usada como sonda.

Uma etapa crítica da ISH é a escolha e o preparo da sonda a ser utilizada. Existem várias formas de se preparar a sonda, uma das mais usadas é aquela na qual após amplificação do RNA por RT-PCR (*reverse-transcriptase* PCR), para genes com sequência conhecida obtida na página do NCBI, por exemplo, e síntese do cDNA, o produto é clonado em vetor que possui sítios para enzimas RNA polimerases, como SP6 e T7, que promovem transcrição *in vitro* levando à obtenção da sonda (ver protocolo). Essa sonda de RNA é de fita simples, o que aumenta a eficiência da Hibridação. As sondas podem ser produzidas e marcadas com digoxigenina-UTP usando kits disponíveis comercialmente, ou seguindo o protocolo descrito a seguir. As sondas de RNA possuem um tamanho ótimo de 200 a 500 pares de base, embora sondas maiores possam ser utilizadas (Valenzuela, 2006).

Estringência

O termo estringência descreve se as condições da reação de Hibridação favorecem ou não a formação de pontes de hidrogênio. As pontes de hidrogênio mantêm as fitas de ácidos nucleicos unidas, e muitas condições podem afetar essas ligações. Assim, a condição que desfavorece a formação de pontes de hidrogênio e, portanto exige maior identidade de sequência para que duas moléculas de ácido nucleico permaneçam hibridadas é descrita como de maior estringência.

A estringência é controlada pela temperatura, condições iônicas e concentração de moléculas que dificultam a formação de híbridos (exemplo, formamida) na solução de Hibridação, também chamados de agentes desnaturantes, e nas soluções de lavagem pós-Hibridação. Sob condições de alta estringência, apenas sonda com grande similaridade à sequência em estudo continuará hibridizada. Em condições de baixa estringência, a probabilidade de pareamento inadequado de nucleotídeos aumenta, e a especificidade diminui. Muitas variações na solução de pré-Hibridação ou Hibridação são sugeridas em vários protocolos de Hibridação *in situ*, todos tentando obter a melhor estringência, de forma a favorecer um sinal específico. Além de diferentes soluções salinas, os reagentes de bloqueio também variam e incluem RNA de levedura, esperma de salmão, solução de Denhardt e suas combinações.

A temperatura e as concentrações de sais têm um efeito direto no resultado da Hibridação. A temperatura de Hibridação a ser utilizada pode ser calculada por diferentes fórmulas. Uma fórmula usada para híbridos de RNA-RNA é *temperatura de melting* (T_m) = $79,8 + 18,5 \log (+Na) + 0,58 (\% GC) + 0,0012 (\% GC)^2 - 820/$

número de pares de base - 0,35 (% formamida) - 500/pares de base da sonda. A mesma fórmula é modificada para híbridos de RNA-DNA, $T_m = 79,8 + 18,5 \log (+Na) + 0,58 (\% GC) + 0,0012 (\% GC)^2 - 820/$ número de pares de base - 0,5 (% formamida). No entanto, a T_m também deve ser otimizada, e a temperatura para se iniciar essa otimização pode ficar entre 15 e 25°C abaixo da T_m obtida pela fórmula. Além disso, híbridos de RNA-RNA são geralmente 10-15°C mais estáveis que os de DNA-DNA ou DNA-RNA e, portanto, as condições de estringência devem ser maiores. O sódio (Na) na fórmula é dado pela sua concentração na Solução de Cloreto de Sódio e Citrato de Sódio (SSC, Tabela 15.2). Deve-se lembrar que em soluções com baixa concentração de sais (baixa força iônica) as fitas tendem a se separar mais facilmente.

Hibridação

Estando a sonda e a sequência-alvo em fita única (para a detecção de sequências de DNA é necessário desnaturar primeiro), geralmente, deixa-se a sonda para hibridar por 18 horas. Para sondas de DNA, a temperatura fica em torno de 37°C, e para sondas de RNA, entre 50 e 55°C, o que geralmente se situa de 15 a 25°C abaixo da T_m . Para sondas marcadas com radioisótopos, a concentração pode ficar de 0,1 a 0,3 ng/mL por kb, e sondas não radiativas geralmente são usadas em concentrações maiores, de 0,5 a 2 ng/mL. As sondas em concentração alta produzem sinal de fundo inespecífico.

As sondas são aplicadas sobre o material na solução denominada de Hibridação. Dentre os possíveis reagentes presentes nessa solução, temos:

Formamida – agente desnaturante que desestabiliza as pontes de hidrogênio.

SDS – sulfato de sódio dodecila auxilia na penetração da sonda agindo como agente umidificador.

tRNA ou DNA não marcado – bloqueia a Hibridação da sonda a sítios inespecíficos (como citoplasma).

A taxa de Hibridação depende do tamanho da sonda, complexidade da sequência e concentração. Em geral, sondas longas têm uma taxa mais lenta devido à difusão limitada no tecido.

Tão importante quanto a Hibridação é a lavagem pós-Hibridação. Essa lavagem é geralmente realizada com uma solução um pouco mais estringente que a solução de Hibridação para retirar a sonda que está incompletamente associada. A temperatura de lavagem pós-Hibridação difere da temperatura de Hibridação,

a 20°C abaixo, e essa temperatura é sendo determinada empiricamente.

Detecção da Sonda

Nas reações de Hibridação, a força da ligação entre a sonda e a sequência em estudo é muito importante. Essa força é maior para as ligações RNA-RNA, decrescendo para DNA-RNA e DNA-DNA. A estabilidade da ligação também é influenciada pelas condições da Hibridação, como concentração da formamida, concentração de sais, temperatura, entre outros.

Vários são os sistemas de detecção e marcação da reação de Hibridação e, dentre eles, um dos mais conhecidos por se mostrar mais sensível e durável é o da biotina. Nesse sistema, a sonda marcada com biotina é detectada por meio da interação com uma estreptavidina previamente conjugada a um “repórter”, que geralmente é uma enzima como a fosfatase alcalina, por exemplo. Esta última, quando em contato com seu substrato, torna-se capaz de hidrolisar um substrato colorigênico, fluorogênico ou quimioluminescente.

Um fato que deve ser ressaltado é que a biotina se encontra presente em praticamente todos os tecidos de ma-

míferos, o que leva à tendência de ligações inespecíficas, possibilitando o surgimento de um *background* ou sinal de fundo. Visando contornar esse inconveniente, passou-se a substituir a biotina por digoxigenina. A tabela 15.3 compara diferentes tipos de marcação da sonda.

A digoxigenina, por sua vez, é detectada por meio do anticorpo antidigoxigenina (DIG/anti-DIG) conjugado a uma enzima repórter normalmente representada por fosfatase alcalina, peroxidase, β-galactosidase, xantina oxidase, ou glicose-oxidase.

Recentemente, outra substância que passou a ser empregada com sucesso na marcação de ácidos nucleicos é o 5-(3-aminoali)-dUTP. Este nucleotídeo amino modificado é incorporado ao DNA e marcado por meio de um corante fluorescente aminorreativo (Fig. 15.1).

A maioria dos autores obtém bons resultados sem contracoloração dos cortes analisados, outros utilizam hematoxilina seguida de montagem com lamínula e *Permount*.

Tabela 15.2 – Concentração de íon Na+ em diferentes soluções de tampão citrato de sódio (SCC).

SCC	[Na+] M
20×	3.3000
10×	1.6500
5×	0,8250
2×	0,3300
1×	01650
0,1×	0,0165

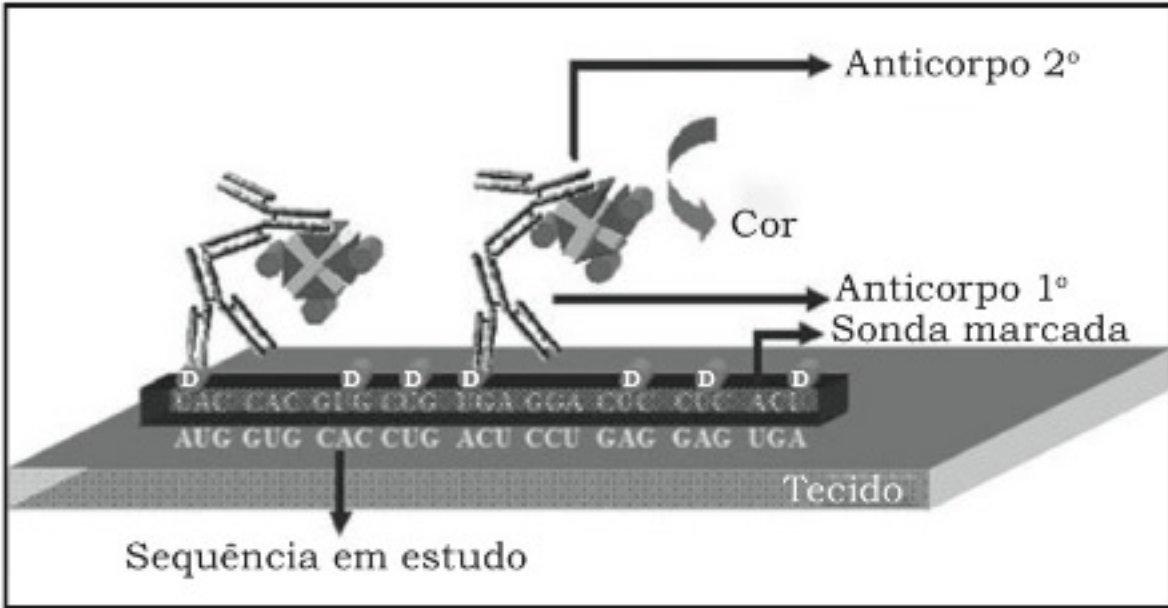


Figura 15.1 – Esquema da Hibridação *in situ* mostrando sonda *antisense* marcada com digoxigenina complementar à sequência em estudo presente no tecido no qual é expressa, sendo detectada por anticorpo primário antidigoxigenina e anticorpo secundário biotilado após exposição à estreptavidina-peroxidase para o desenvolvimento da coloração que evidenciará a reação.

Tabela 15.3 – Comparação do tipo de marcação de sondas (adaptado de Polak, McGee, 1990).

Marcador	Resolução	Sensibilidade	Exposição (dias)	Estabilidade (semanas)
32P	+	++	7	0,5
35S	++	+++	10	6
3H	+++	+++	14	> 30
Biotina	+++	++	0,16	> 52
Digoxigenina	+++	+++	0,16	> 52

Redução da Ligação Não Específica (*Background*)

Tornar reduzido o sinal de fundo, não específico, é também crítico para a reação de Hibridação. O sinal inespecífico origina-se principalmente da retenção inespecífica da sonda nos cortes de tecido, devido a interações eletrostáticas entre a sonda e macromoléculas, por exemplo, e a retenção da sonda na malha tridimensional do tecido. Alguns protocolos tentam minimizar o *background* tratando os cortes com anidrido acético e trietanolamina, o que pode ser importante para reduzir o sinal inespecífico de sondas maiores que 2 kb (Hayashi, 1978; Lawrence; Singer, 1985). Outra forma de reduzir a ligação não específica é tratar os cortes com uma solução de pré-Hibridação, muitas vezes a solução de Hibridação sem a sonda, e que pode incluir albumina bovina, heparina, levamisol, ácidos nucleicos etc. Esses reagentes não previnem completamente o sinal de fundo, por isso alguns grupos tratam os cortes com RNase (degrada a sonda de fita única não hibridada) e aumentam a estringência da reação, além de monitorar constantemente a reação de coloração para minimizar o tempo de exposição dos reagentes aos tecidos.

Quantificação

A quantificação em Hibridação *in situ* é normalmente feita pela quantificação do sinal e não do número de cópias de mRNA da célula. Na literatura existem diferentes métodos descritos para quantificar esse sinal. A metodologia de quantificação depende da técnica de detecção empregada: a quantificação de sondas radiativas é feita pela contagem do número de grãos de prata por unidade de área do tecido e para sondas não radiativas normalmente se quantifica a intensidade do sinal por técnicas de digitalização da imagem e análise por computador. Os dois métodos apresentam problemas, o principal deles é que a intensidade da marcação depende de fatores intrínsecos ao tecido analisado, características da fixação, como tempo e concentração do fixador, fatores inerentes à permeabilização do tecido, como tipo de enzima, concentração, tempo de digestão etc.

Para a Hibridação com sonda não radiativa, um dos maiores problemas é a variação da intensidade do sinal no mesmo corte de tecido. Essa variação da eficiência de Hibridação pode ser parcialmente superada pelo uso de um controle interno.

Controle

Quando se faz a reação de Hibridação *in situ*, é muito importante usar procedimentos de controle para

se certificar que o sinal observado é específico para a sequência-alvo. Várias são as possibilidades de controle mencionadas na literatura. Uma das mais utilizadas, e de nossa preferência, é o uso da sonda *sense*, que mostra se o padrão de marcação obtido é específico para a sequência que se quer estudar. Outro controle é o uso de múltiplas sondas para a mesma sequência gênica, o que informaria que sequências similares à estudada estão sendo detectadas. Quando detectando transcritos, é possível aplicar RNase no tecido antes da utilização da sonda, o que eliminaria a detecção da sequência específica. Outra possibilidade é utilizar RNase após a Hibridação, o que reduziria o sinal de fundo (*background*), mas o RNA hibridado à sonda seria mantido. Alguns trabalhos que utilizam sondas marcadas com isótopos radiativos omitem a aplicação da sonda para controlar a possibilidade de artefatos autorradiográficos. Outro controle eventualmente utilizado é localizar por imunistoquímica a proteína daquele gene, mostrando que proteína e gene estão presentes. Porém, o resultado negativo desse último controle não implica necessariamente falha da Hibridação, mas pode advir da não tradução do mRNA, por exemplo.

Protocolo de Síntese da Sonda

Digestão

1. Em um tubo de 1,5 mL misturar os seguintes reagentes, deixando o tampão e a enzima para ser adicionados por último, para diminuir a exposição à temperatura ambiente:

H₂O ultrapura tratada com DEPC.....2,5 µL
ou q.s.p. 10 µL

DNA plasmidial.....concentração de 5 µg/mL

Tampão indicado para enzima.....1,0 µL

Endonuclease de restrição.....1,5 µL

2. Misturar bem sob agitação e deixar a 37°C durante 2 a 12 horas

Síntese

3. Em novo tubo adicionar os seguintes reagentes:

DNA digerido (linearizado).....2 µL

Água ultrapura tratada com DEPC.....8 µL

Tampão.....4 µL

DTT.....2 µL

dNTP (marcado).....2 µL

- Inibidor de RNase.....1 µL
RNA polimerase.....1 µL
- Misturar bem sob agitação e deixar a 37°C durante 1 a 2 horas e depois manter a -20°C.
 - Antes do uso e para manter em estoque, fazer digestão do DNA adicionando 2 µL de DNase (sem RNase) e manter a 37°C durante 15 minutos, depois adicionar os seguintes reagentes:
 - 100 µL de água ultrapura tratada com DEPC.
 - 10 µL de 4 M LiCl.
 - 300 µL de etanol a 100%.
 - Agitar e manter a -20°C.

Solução de Nucleotídeos (dNTP Marcado)

- De uma solução de estoque de ATP, GTP, CTP e UTP a 100 mM, adicionar os seguintes volumes em um tubo:

GTP.....	7,14 µL
ATP.....	7,14 µL
CTP.....	7,14 µL
UTP.....	4,64 µL
UTP marcado.....	25,0 µL
Água ultrapura tratada com DEPC.....	20,37 µL

Solução de Pré-hibridação

Reagente	Concentração final
Formamida	50%
SSC (pH 4,5).....	5×
Heparina.....	50 µg/mL
Yeast RNA.....	50 µg/mL
SDS.....	1%
Água ultrapura tratada com DEPC.....	50 mL

Protocolo de Hibridação para Detecção de mRNA em Cortes Congelados

1º dia

- Aquecer à temperatura ambiente as lâminas com os cortes congelados que estavam mantidas a -80°C, e deixá-las secar completamente. Com uma pipeta estéril pós-fixar os cortes com uma solução de pa-

raformaldeído a 4% e glutaraldeído a 0,2% em PBS à temperatura ambiente (TA) durante 10 minutos.

- Transferir as lâminas para um recipiente e lavar 3× com PBT (Quadro 15.1) durante 5 minutos à TA. Certificar-se que as lâminas estão completamente submersas. Em seguida, incubar durante 5 minutos à TA em água oxigenada a 6% em PBT, (Quadro 15.1) e lavar novamente 3× com PBT durante 5 minutos à TA.
- Tratar com proteinase K 10 µg/mL em PBT (Quadros 15.1 e 15.2) durante 2 minutos, sendo que a concentração da enzima e a duração da digestão devem ser otimizadas (pois ótimo resultado depende do tipo de tecido, espessura, tempo de fixação, entre outros fatores).
- Lavar rapidamente com glicina 2 mg/mL em PBT durante 30 segundos e lavar novamente durante 10 minutos à TA. Então lavar 3× com PBT durante 5 minutos à TA e novamente fixar os cortes com uma solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 0,2% em PBS à TA durante 10 minutos (se for utilizar sonda fluorescente, omitir o glutaraldeído). Lavar adicionalmente 3× com PBT durante 5 minutos à TA.
- Empilhar as lâminas com divisores entre elas (lâminas plásticas), em número máximo de quatro, em um saco plástico. Acrescentar cuidadosamente, com pipeta estéril, 4 mL de solução de pré-Hibridação aquecida a 70°C (Quadros 13a-b), selar com calor, prender com grampo e incubar em forno de Hibridação a 70°C sob agitação durante 1 hora (Figs. 15.1, 15.2 A e B). Após esse período, retirar 1 mL de solução, adicionar o mesmo volume da solução de pré-Hibridação contendo a sonda e incubar no forno sob agitação durante 18 horas.

2º dia

- Desmontar as lâminas, colocá-las em um recipiente contendo a **solução 1** de lavagem pós-Hibridação (Quadro 15.4) pré-aquecida a 70°C e lavar 3× durante 15 minutos. Então lavar novamente em um outro recipiente contendo a **solução 2** da lavagem pós-Hibridação (Quadro 15.5) pré-aquecida a 65°C e lavar 3× durante 15 minutos.
- Mudar as lâminas de recipiente e lavar 3× de 15 minutos cada com TBST (Quadros 15.6 e 15.7) à TA. Bloquear os sítios antigênicos inespecíficos com soro bovino a 10% em TBST durante 1 hora e transferir as lâminas para os sacos selados pelo calor, como des-

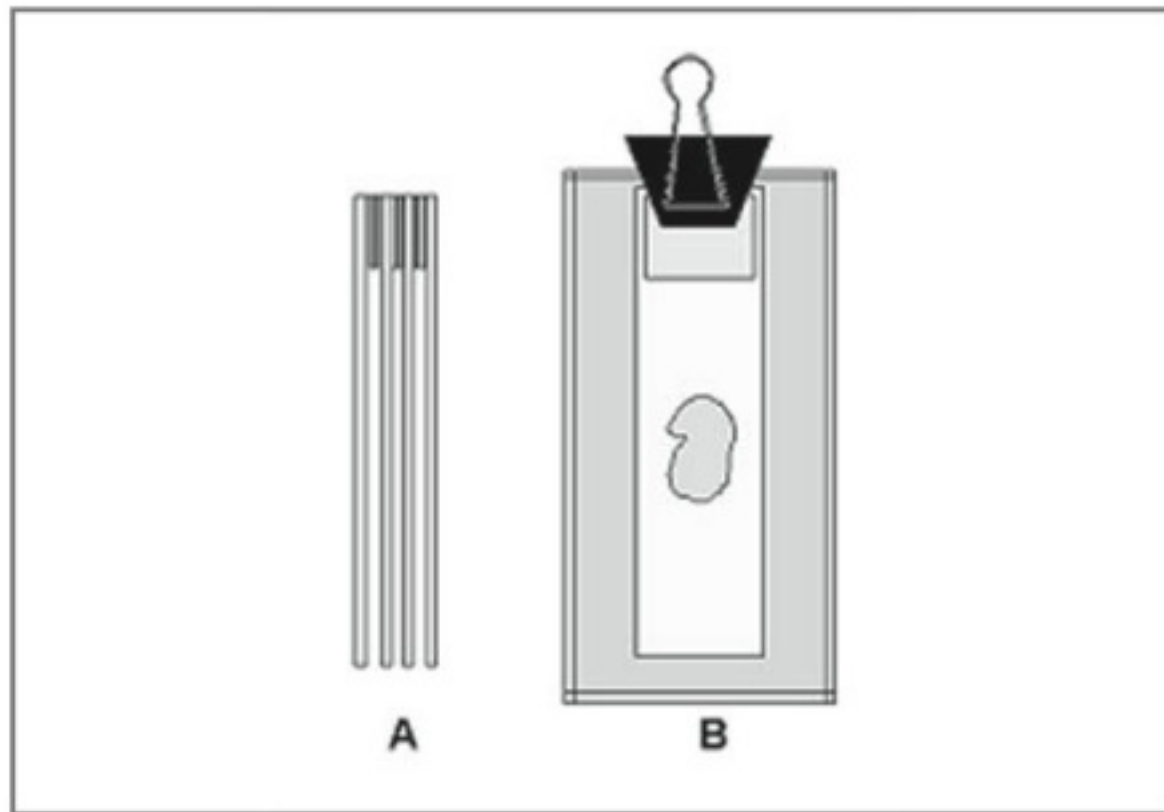


Figura 15.2 – Montagem das lâminas em saco plástico. (A) Lâminas separadas por lamínulas de plástico. (B) Lâminas montadas em saco plástico selado por calor e contendo 4 mL de solução de Hibridação.

crito anteriormente, adicionando 5 mL de anticorpo antidigoxigenina (1:2.000 em soro bovino a 1% em TBST) e incubar sob agitação 18 horas a 4°C.

3^o dia

- Retirar as lâminas dos sacos plásticos e lavá-las com TBST concentrado 3× durante 5 minutos e novamente 3× durante 30 minutos à TA. Então lavar novamente 3× durante 10 minutos com solução NTMT (Quadro 15.8).
- Incubar durante 18 horas à TA e no escuro com NBT/BCIP em NTMT (Quadros 15.8 e 15.9), acompanhando a reação no microscópio ou lupa.

4^o dia

- Parar a reação com EDTA 1 mM em PBT (Quadro 15.10) durante 30 minutos. Lavagens adicionais e pós-fixação com paraformaldeído/glutaraldeído são opcionais. Secar as lâminas e montar com lamínulas e gelvitol. Exemplos de resultados são mostrados na figura 15.3.

Protocolo de Hibridação para Detecção de DNA em Tecido Parafinado

- Fazer cortes de 5 mm de espessura em lâminas de vidro, as quais foram previamente lavadas em solução de extrana 2,5%, autoclavadas, e preparadas em solução de 3-aminopropitrietoxisilano (Sigma Chemical CO., St Louis, MO/USA) a 10% em álcool

absoluto e finalmente enxugadas com água ultrapura tratada com dietilpírocarbonato (DEPC).

- Desparafinizar os cortes do material embocado em parafina em três banhos de xilol, um a 60°C por 30 minutos, e os outros dois em temperatura ambiente por 5 minutos cada. Reidratar em série descendente de etanol, a partir de duas passagens em etanol absoluto, seguidos por três passagens em etanol a 95%, por 1 minuto cada.
- Após lavagem em três banhos de água destilada, as lâminas receberão tratamento no forno de micro-ondas. Neste momento, estarão imersas em solução própria do *kit* (TRS) por 10 minutos com a temperatura não ultrapassando 95°C. Depois do tratamento, os cortes serão novamente lavados em água destilada e seguirão para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual, para o qual serão realizados dois banhos de 10 minutos cada em solução 1:10 de peróxido de hidrogênio de 30 volumes e metanol. Os cortes serão então incubados com a sonda, cobertos com uma lamínula e levados a uma placa de aquecimento à temperatura de 95°C durante 5 minutos. Para a Hibridação, as lâminas ficarão submersas em câmara úmida a 37°C durante 18 horas.
- Todos os procedimentos seguintes são semelhantes à técnica de imunoistoquímica, com incubação dos

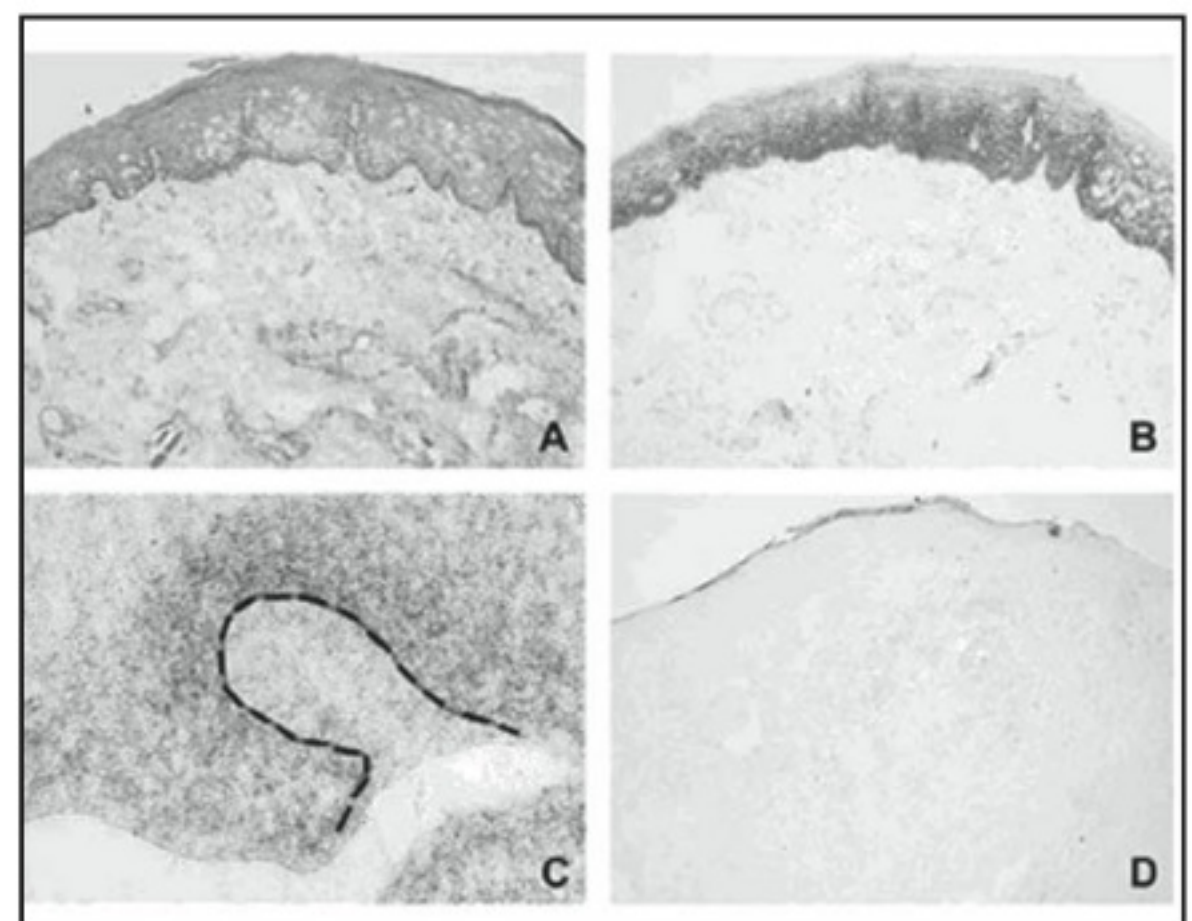


Figura 15.3 – (A) Corte de mucosa de boca de humano sequencial a B (HE, 100×). (B) Hibridação *in situ* mostrando sinal para transcritos do gene HOXA7 identificados por sonda *antisense* (NBT/BCIP, 100×). (C) Sinal para transcritos do gene Wnt-5a circundando germe dentário (contornado por linha vermelha), em corte axial da cabeça de embrião de camundongo no estágio 21 do desenvolvimento (NBT/BCIP, 250×). (D) Ausência de sinal após utilização da sonda *sense* para HOXA7. Observar que a cor obtida em B e C foi diferente, o que pode acontecer na dependência de fatores como tempo de reação e tempo de preparo dos reagentes.

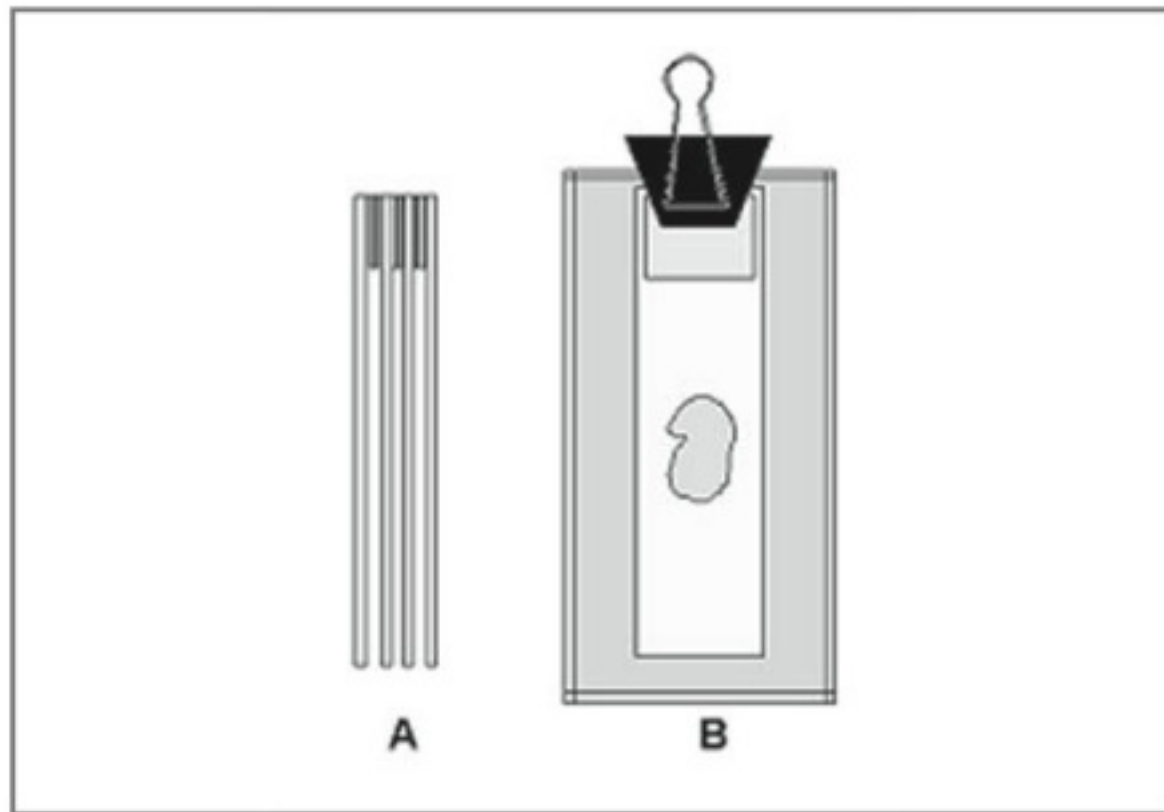


Figura 15.2 – Montagem das lâminas em saco plástico. (A) Lâminas separadas por lamínulas de plástico. (B) Lâminas montadas em saco plástico selado por calor e contendo 4 mL de solução de Hibridação.

crita anteriormente, adicionando 5 mL de anticorpo antidigoxigenina (1:2.000 em soro bovino a 1% em TBST) e incubar sob agitação 18 horas a 4°C.

3^o dia

- Retirar as lâminas dos sacos plásticos e lavá-las com TBST concentrado 3× durante 5 minutos e novamente 3× durante 30 minutos à TA. Então lavar novamente 3× durante 10 minutos com solução NTMT (Quadro 15.8).
- Incubar durante 18 horas à TA e no escuro com NBT/BCIP em NTMT (Quadros 15.8 e 15.9), acompanhando a reação no microscópio ou lupa.

4^o dia

- Parar a reação com EDTA 1 mM em PBT (Quadro 15.10) durante 30 minutos. Lavagens adicionais e pós-fixação com paraformaldeído/glutaraldeído são opcionais. Secar as lâminas e montar com lamínulas e gelvitol. Exemplos de resultados são mostrados na figura 15.3.

Protocolo de Hibridação para Detecção de DNA em Tecido Parafinado

- Fazer cortes de 5 mm de espessura em lâminas de vidro, as quais foram previamente lavadas em solução de extrana 2,5%, autoclavadas, e preparadas em solução de 3-aminopropitrietoxisilano (Sigma Chemical CO., St Louis, MO/USA) a 10% em álcool

absoluto e finalmente enxugadas com água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC).

- Desparafinizar os cortes do material embocado em parafina em três banhos de xilol, um a 60°C por 30 minutos, e os outros dois em temperatura ambiente por 5 minutos cada. Reidratar em série descendente de etanol, a partir de duas passagens em etanol absoluto, seguidos por três passagens em etanol a 95%, por 1 minuto cada.
- Após lavagem em três banhos de água destilada, as lâminas receberão tratamento no forno de micro-ondas. Neste momento, estarão imersas em solução própria do *kit* (TRS) por 10 minutos com a temperatura não ultrapassando 95°C. Depois do tratamento, os cortes serão novamente lavados em água destilada e seguirão para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual, para o qual serão realizados dois banhos de 10 minutos cada em solução 1:10 de peróxido de hidrogênio de 30 volumes e metanol. Os cortes serão então incubados com a sonda, cobertos com uma lamínula e levados a uma placa de aquecimento à temperatura de 95°C durante 5 minutos. Para a Hibridação, as lâminas ficarão submersas em câmara úmida a 37°C durante 18 horas.
- Todos os procedimentos seguintes são semelhantes à técnica de imunoistoquímica, com incubação dos

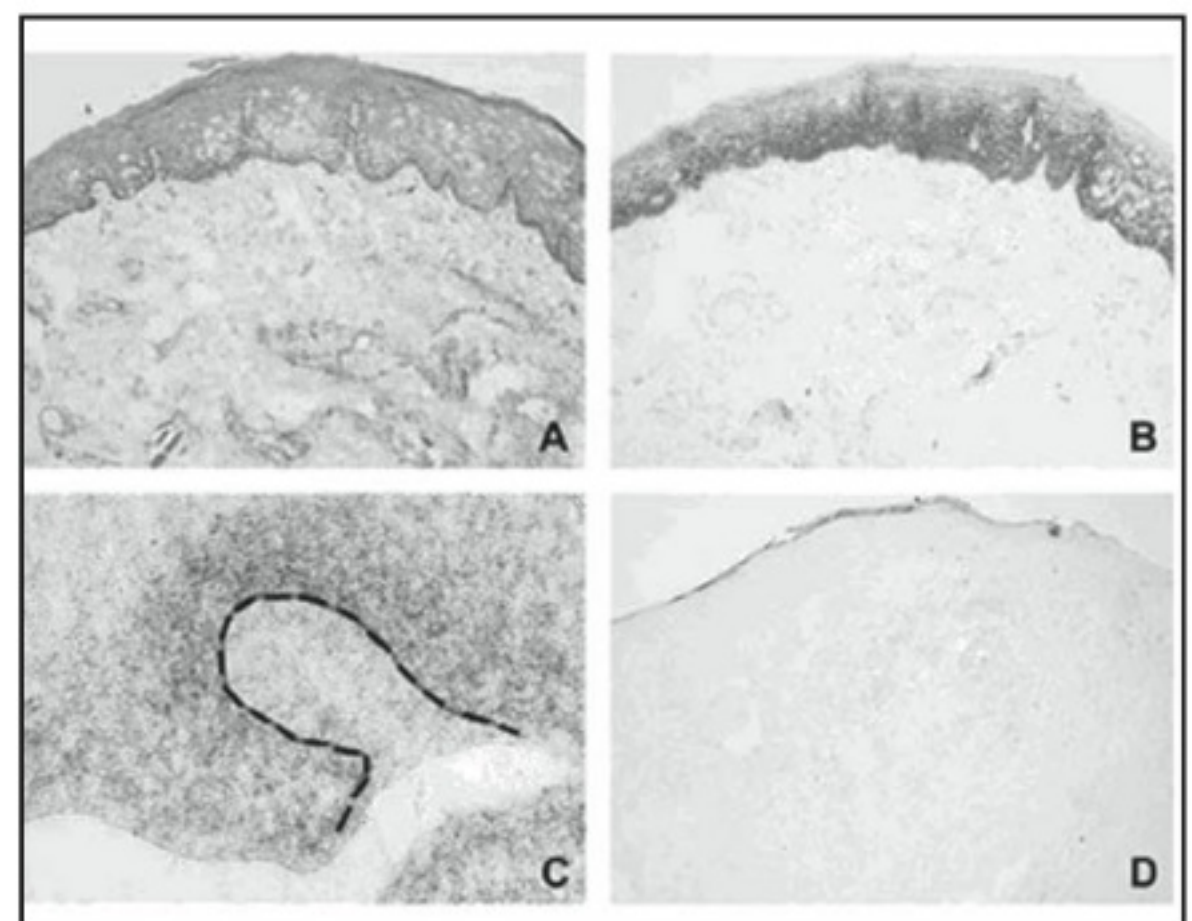


Figura 15.3 – (A) Corte de mucosa de boca de humano sequencial a B (HE, 100×). (B) Hibridação *in situ* mostrando sinal para transcritos do gene HOXA7 identificados por sonda *antisense* (NBT/BCIP, 100×). (C) Sinal para transcritos do gene Wnt-5a circundando germe dentário (contornado por linha vermelha), em corte axial da cabeça de embrião de camundongo no estágio 21 do desenvolvimento (NBT/BCIP, 250×). (D) Ausência de sinal após utilização da sonda *sense* para HOXA7. Observar que a cor obtida em B e C foi diferente, o que pode acontecer na dependência de fatores como tempo de reação e tempo de preparo dos reagentes.

cortes em anticorpo primário e secundário, precedidos de lavagens com Tris pH 7,6 e TBST (50 mM Tris-HCl, pH 7,6 e *Tween* 20 a 2%). Em seguida, os cortes são revelados (ex.: DAB, 3,3-diaminobenzidina, Sigma Chemical Co.) e, então, contracolorados com hematoxilina de Mayer, desidratados em série crescente de etanóis, diafanizados em xilol, montados em resina e examinados sob microscopia de luz.

Protocolo de Hibridação para Detecção de RNA em Embriões Inteiros

As soluções empregadas no decorrer do protocolo são as mesmas utilizadas em cortes congelados

1º dia

1. Dissecar os embriões em PBS removendo membranas e outros tecidos se necessário e fixar em paraformaldeído a 4% a 4°C durante 18 horas, sob agitação cuidadosa. O volume do agente fixador e das soluções descritas a seguir deve ser de ao menos cinco vezes o volume do embrião.
2. Lavar duas vezes com PBT a 4°C durante 5 minutos sob agitação. Lavar três vezes com concentrações crescentes de metanol (25%, 50% e 75% em PBT), e 100 % de metanol, durante 15 minutos e sob agitação à TA.
3. Reidratar as amostras três vezes, durante 5 minutos, em concentrações decrescentes de metanol (75%, 50% e 25% em PBT), e 100% de PBT, sob agitação à TA. Então incubar em peróxido de hidrogênio a 6% em PBT durante uma hora sob agitação à TA.
4. Tratar os embriões com proteinase K 10 µg/mL em PBT, durante 15 minutos, à TA (essas condições devem ser otimizadas de acordo com a espécie do embrião e seu estágio de desenvolvimento). Então, lavar com glicina 2 mg/mL em PBT durante 10 minutos à TA, e novamente apenas com PBT três vezes durante 5 minutos à TA.
5. Pós-fixar embriões com paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 0,2% em PBT, durante 20 minutos à TA. Lavar três vezes com PBT durante 5 minutos à TA.
6. Transferir os embriões para tubos de 1,5 mL com anel de vedação e adicionar 1 mL de solução de Hi-

bridção sem a sonda. Misturar gentilmente por inversão e trocar a solução, para então incubar a 70°C durante 1 hora (pré-Hibridação).

7. Adicionar à solução 1 µg/mL de sonda marcada e manter a Hibridação a 70°C durante 18 horas em banho-maria.

2º dia

8. Transferir embriões para recipiente com a solução 1 de pós-Hibridação pré-aquecida e lavar três vezes durante 30 minutos a 70°C, sob agitação.
9. Lavar com a solução 2 de pós-Hibridação pré-aquecida três vezes durante 30 minutos a 65°C, sob agitação. Em seguida lavar três vezes com TBST sob agitação à TA.
10. Transferir os embriões em TBST para tubos de 1,5 mL com anel de vedação e adicionar soro normal de cabra ou bovino a 10% em TBST e incubar durante 2,5 horas sob agitação à TA.
11. Adicionar anticorpo antidigoxigenina (1:2.000 em soro bovino a 1% em TBST) e incubar sob agitação 18 horas a 4°C.

3º dia

12. Retirar os embriões dos tubos e lavar três vezes durante 5 minutos em TBST sob agitação à TA. Então lavar durante todo o dia, com trocas a cada 45 minutos, em TBST sob agitação à TA e durante 18 horas a 4°C.

4º dia

13. Lavar rapidamente com TBST três vezes durante 5 minutos sob agitação à TA, então quatro vezes, com a mesma solução, durante 15 minutos à TA. Lavar com NTMT três vezes durante 5 minutos sob agitação à TA, e quatro vezes durante 30 minutos à TA.
14. Incubar com NBT/BCIP em NTMT, protegido da luz e sob agitação, verificando a cada hora o desenvolvimento da cor. Parar com a lavagem em PBT durante 10 minutos à TA. Pós-fixar com paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 0,2% em PBS durante 1 hora, então lavar duas vezes com PBT e estocar a 4°C ou lavar em PBT/glicerol a 50%-80% (Koopman, 2001).

Soluções e Tampões

Quadro 15.1 – Tampão Fosfato Salina + *Tween* (PBT).

Reagente	Volume
<i>Tween</i> 20 a 10%	10mL
PBS concentrado 10x*	100mL
Água ultrapura estéril-quantidade suficiente para (q.s.p.)	1 litro

* PBS – Tampão fosfato salina.

Quadro 15.2 – Solução de Proteinase K em PBT.

Reagente	Volume
Proteinase K	100 µL (solução estoque 20 mg/mL)
PBT	200 mL

Quadro 15.3a – Solução de Cloreto de Sódio e Citrato de Sódio (SSC) concentrada 20 x (pH 4,5).

Reagente	Volume
SSC concentrada 20x -pH 7,0	250 mL
Ácido cítrico à 1 M	50 mL

Quadro 15.3b – Solução de Pré-hibridação.

Reagente	Volume	Concentração final
Formamida	25 mL	50%
SSC concentrada 20x (pH4,5)*	15 mL	5 x
Heparina (20mg/mL)	125 µL	50 µg/mL
RNA de levedura (5mg/mL)	0,5 mL	50 µg/mL
SDS á 10%	5mL	1%
Água ultrapura tratada com DEPC q.s.p.		50mL

*SSC - Solução Cloreto de Sódio e Citrato de Sódio.

Quadro 15.4 – Solução 1 de Pós-hibridação.

Reagente	Volume
Formamida	500 mL
SSC concentrada 20x (pH4,5)*	300 mL
SDS à 10%	100 mL
Água ultrapura estéril	100 mL

*SSC – Solução Cloreto de Sódio e Citrato de Sódio.

Quadro 15.5 – Solução 2 de Pós-hibridação.

Reagente	Volume
Formamida	500 mL
SSC concentrada 20x (pH4,5)	120 mL
Água estéril	380 mL

Quadro 15.6. – Tampão Tris salina (TBS) concentrado 10x.

Reagente	Volume
NaCl	12 g
KCl	0,3 g
Tris à 1M (pH7,5)	37,5 mL
Água ultrapura estéril	112,5 mL

Quadro 15.7 – Tampão Tris Salina + *Tween* (TBST).

Reagente	Volume
TBS concentrada 10x	150 mL
<i>Tween</i> à 20 10%	150 mL
Levamisole	0,6 g
Água ultrapura estéril q.s.p	1,5 L

Quadro 15.8 – Solução *NTMT.

Reagente	Volume
NaCl à 5M	20 mL
Tris-HCl à 2M (pH9,5)	50 mL
MgCl ₂ à 2M	0,5 mL
<i>Tween</i> 20 à 10%	10 mL
Água ultrapura estéril q.s.p.	1 litro

*NTMT - Cloreto de Sódio-Tris-HCl-MgCl₂-*Tween*.

Quadro 15.9 – Solução de NBT/BCIP) – Sensível à luz.

Reagente	Volume
NTMT	200mL
NBT/dimetilformamida*	675 µL (0,075g/ 1mL DMF á 70%)
BCIP**	525 µL (0,05g/ 1mL água)

*NBT – Cloreto de 4-Nitroazul de Tetrazólio.

**BCIP – 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato.

Quadro 15.10 – Solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA)/PBT à 1mM

Reagente	Volume
EDTA a 0,5M	600 µL
PBT	300 mL

Solução de hidróxido de hidrogênio (H_2O_2)/PBT

Reagente	Volume
H_2O_2 a 30%	50 mL
PBT	200 mL

Referências

- Feldman, R.S.; Meyer, J.S.; Quenzer, L.F. *Principles of Neuropsychopharmacology*, Sunderland, Mass: Sinauer Associates; 1997, 1 v. (various pagings).
- Hayashi, S.; Gillam, I.C.; Delaney, A.D.; Tener, G.M. Acetylation of chromosome squashes of *Drosophila melanogaster* decreases the background in autoradiographs from hybridization with [^{125}I]-labeled RNA. *J. Histochem. Cytochem.*, 26(8):677-679, 1978.
- Koopman, P. In situ hybridization to mRNA: from black art to guiding light. *Int. J. Dev. Biol.*, 45(3):619-622, 2001.
- Lawrence, J.B.; Singer, R.H. Quantitative analysis of in situ hybridization methods for the detection of actin gene expression. *Nucleic Acids Res.*, 13(5):1777-1799, 1985.
- Lodish, H.F. *Molecular Cell Biology*. 4th ed. 2000. New York: W.H. Freeman; xxxvi, 1084, G-17, I-36p.
- Polak, J.M.; McGee, J.O.D. *In Situ Hybridization: Principles and Practice*. Oxford Science Publications. Oxford ; New York: Oxford University Press, x, 1990, 247 p.
- Silva-Valenzuela, M.G.; Almeida, F.C.S.; Matizonkas-Antonio, L.F.; Libório, T.N.; Acquafreda, T.; Cazal, C.; Ferraz, A.; Nunes, F.D. Hibridação in situ com sonda não-radiativa para mRNA: princípios e aplicações em patologia. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, 42(3):207-213, 2006.
- Strachan, T.; Read, A.P. *Human Molecular Genetics 2*. 2nd ed., New York: Wiley-Liss; xxiii, 1999. 576p.
- Wheeler, G.; Valoczi, A.; Havelda, Z.; Dalmay, T. In Situ Detection of Animal and Plant MicroRNAs. *DNA Cell Biol.*, 26(4):251-255, 2007.

16. Proteínas e a Origem da Vida

*Dimas Augusto Morozin Zaia
Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia
Rogério Fernandes de Souza*

Introdução

A grande maioria das reações químicas, que ocorrem em qualquer parte de uma célula e em qualquer ser vivo do nosso planeta, de alguma forma envolve proteínas. As proteínas desempenham diversas funções nos seres vivos, tais como catalisadoras (enzimas), transportadoras, nutrientes e de armazenamento, contráteis ou de motilidade, estruturais, defesa, reguladoras etc. As proteínas são constituídas de subunidades denominadas aminoácidos. Cerca de 20 aminoácidos diferentes podem fazer parte das proteínas dos organismos vivos. Ou seja, estas moléculas são construídas a partir de um alfabeto composto por 20 letras. Todos os aminoácidos, com uma única exceção, que é a prolina, possuem um grupo amino, um grupo carboxila ($-\text{COOH}$) e um grupo R (também conhecido como cadeia lateral). No caso da prolina, em vez do grupo amino ($-\text{NH}_2$) temos o grupo imino ($-\text{NH}-$). Os aminoácidos que constituem as proteínas podem ser construídos por um carbono central, chamado de carbono alfa (C_α), e ligado a este temos um grupo amino ($-\text{NH}_2$) ou imino ($-\text{NH}-$), um átomo de hidrogênio ($-\text{H}$), um grupo carboxila ($-\text{COOH}$) e um grupo R ($-\text{R}$). Portanto, qualquer um dos 20 aminoácidos protéicos possuem a seguinte fórmula geral ($\text{RHC}_\alpha\text{NH}_2\text{COOH}$). O que diferencia um aminoácido do outro é sua cadeia lateral ou o grupo R. Podemos classificar os aminoácidos de acordo com sua cadeia lateral da seguinte forma: não polares (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina); aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptofano); polares mas não carregados (serina, treonina, cisteína, metionina, asparagina, glutamina); carregados negativamente (aspartato, glutamato) e carregados positivamente (lisina, arginina, histidina). Os grupos R dos aminoácidos desempenham um papel muito importante na conformação de peptídeos e proteínas. Todos os aminoácidos possuem um centro quiral (com exceção da glicina), pois o carbono alfa está ligado a quatro grupos substituintes diferentes.

Portanto, todos os aminoácidos (com exceção da glicina) possuem dois estereoisômeros, o isômero-L e o isômero-D, sendo que um é a imagem especular do outro. Em uma reação química, de qualquer síntese de aminoácidos sempre obtemos o que chamamos de mistura racêmica, ou seja, temos 50% de cada isômero. No entanto, todos os seres vivos que conhecemos até o momento, possuem quase que somente os isômeros L dos aminoácidos, tanto os livres como na composição de proteínas e peptídeos (Lehninger et al., 2000). Por outro lado, recentemente foram encontrados D-aminoácidos em seres vivos superiores tanto na forma de aminoácidos livres, como em peptídeos e proteínas. D-aspartato e D-serina livres foram encontrados em mamíferos e podem ter importantes funções fisiológicas nestes seres; D-aminoácidos em peptídeos opioides ou neuropeptídeos também foram encontrados em seres vivos superiores. Observa-se ainda que em proteínas os resíduos D-aspartato aumentam com o envelhecimento (Fujiin, 2002).

Devido ao exposto acima, diversas perguntas nos vêm à mente, sendo algumas delas: por que as proteínas se tornaram tão importantes para os seres vivos?; como ocorreu a síntese dos aminoácidos e subsequente formação dos peptídeos e proteínas?; qual ou quais foram os mecanismos utilizados pela natureza para separar os L-aminoácidos dos D-aminoácidos?; como estas moléculas foram incorporadas na atual bioquímica?

A Hipótese de Oparin - Haldane

Após os experimentos de Pasteur que definitivamente derrubaram a teoria da geração espontânea (formação de um ser vivo a partir de matéria inanimada), a comunidade científica tornou-se cética com relação à possibilidade de se estudar o problema da origem da vida em nosso planeta. Pois quanto mais conhecimentos os biólogos acumulavam sobre o funcionamento das células mais se davam conta da sua grande complexidade

e, portanto, não vislumbravam uma maneira de estudar o problema. Por outro lado, os geólogos e os astrofísicos começaram a discutir problemas relativos a composição, formação e idade da Terra, do Sistema Solar e das Estrelas. Este debate na geologia e na astronomia, principalmente na questão da idade da Terra e do Sistema Solar, os quais eram muito mais antigos do que se imaginava, levou o bioquímico russo Alexander I. Oparin, em 1924, e independentemente o geneticista inglês J. B. S. Haldane, em 1929, a proporem um esquema para a origem da vida. Esta proposta é atualmente conhecida como hipótese de Oparin-Haldane e podemos colocá-la resumidamente da seguinte maneira: primeiramente, a partir de moléculas simples que reagiam entre si (por exemplo metano, amônia, hidrogênio), ocorreu a formação e o acúmulo de biomoléculas (aminoácidos, açúcares, lipídios, purinas etc.), isto provavelmente levou um período de milhões de anos; posteriormente, estas biomoléculas começaram a combinar umas com as outras para formar biopolímeros (moléculas gigantes feitas pela repetição de unidades simples, como, por exemplo, as proteínas, que são sintetizadas a partir das unidades de aminoácidos); mais alguns milhões de anos se passaram e estes biopolímeros começaram a se combinar formando o que Oparin chamou de estruturas coacervadas, que lembram muito as células vivas existentes hoje. Conforme o tempo passava (milhões de anos), reações cada vez mais complexas começaram a ocorrer dentro dessas estruturas coacervadas até a formação do primeiro ser vivo sobre o nosso planeta. Portanto, pela primeira vez os cientistas tinham uma maneira de estudar o problema de origem da vida, ou seja, se reproduzirmos em laboratório todas as etapas para a formação de um ser vivo a partir de matéria inanimada poderemos um dia compreender como surgiu a vida em nosso planeta.

Um ramo da ciência que muito tem contribuído para o esclarecimento de como surgiu a vida em nosso planeta é a chamada química prébiótica. A química pré-biótica estuda as reações químicas ou os processos que poderiam ter contribuído para o surgimento do primeiro ser vivo em nosso planeta, sendo que as condições de estudo dessas reações devem reproduzir ambientes que um dia existiram ou ainda existem em nosso planeta. Portanto, os dados geológicos e geoquímicos de composição da Terra, desde da sua formação até o momento, são importantes para reproduzir em laboratório os possíveis ambientes (condições de reação) onde as reações químicas e processos vão ocorrer (Zaia, 2004_a, 2003 e 2001; Kenyon e Steinman, 1969).

Síntese Abiótica de Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas

No atual estágio do desenvolvimento científico na área de química pré-biótica, não podemos dar respostas definitivas para as perguntas que surgem sobre o assunto, porém utilizando os fatos experimentais acumulados até o momento podemos fazer uma série de suposições às perguntas formuladas. Talvez para a primeira pergunta (por que as proteínas se tornaram tão importantes para os seres vivos?) pudéssemos supor que estas moléculas estavam presentes no início da evolução molecular e, devido a suas propriedades, elas foram utilizadas pela natureza para se construir o que chamamos de um ser vivo. A suposição de que as moléculas (aminoácidos, peptídeos, proteínas) estavam presentes no início da evolução molecular levanta uma série de questões, tais como: em qual ou quais ambientes existentes na Terra primitiva ocorreram a formação dos aminoácidos?; qual era a estabilidade destas moléculas nestes ambientes?; as quantidades de aminoácidos formadas eram suficientes para a formação de peptídeos e proteínas?; em qual ou quais ambientes existentes na Terra primitiva ocorreram a formação dos peptídeos e proteínas?; qual era a estabilidade destes polímeros formados?

Vamos começar estudando uma série de condições de reação que reproduzem os possíveis ambientes existentes na Terra primitiva e como aminoácidos e peptídeos podem ser sintetizados nestes ambientes.

Reações com Misturas Gasosas

Reações com misturas gasosas simulam a atmosfera da Terra primitiva. Miller foi o primeiro a mostrar que uma mistura gasosa pode ser a responsável pela síntese de importantes biomoléculas (aminoácidos). Este experimento foi realizado da seguinte forma: dentro de um balão de 5,0 L foi adicionada uma mistura de gases (metano, amônia, hidrogênio) que simulava a atmosfera primitiva da Terra, este balão estava conectado a um balão menor cheio de água aquecida que simulava o mar; devido à água aquecida; os gases circulavam através de dois eletrodos que geravam faíscas elétricas simulando os raios na atmosfera primitiva e que seriam a fonte de energia para as reações químicas. Após algumas semanas, uma análise química da solução aquosa mostrou a existência dos aminoácidos glicina, α -alanina, β -alanina, ácido aspártico e α -aminoácido- η -butírico (Miller, 1953). Miller foi o primeiro a fornecer uma prova experimental confirmando a hipótese de Oparin-Haldane, ou seja, a par-

tir de moléculas simples (metano, hidrogênio, amônia, água) foram formadas moléculas complexas – os aminoácidos – que são essenciais a todos os seres vivos de nosso planeta. No entanto, muitas críticas foram feitas ao experimento de Miller e a outros similares. Uma das principais críticas foi a seguinte: os aminoácidos formados na atmosfera, ao caírem nos oceanos seriam diluídos e o efeito da diluição seria tão grande que dificilmente peptídeos se formariam e em consequência a evolução molecular não ocorreria. Uma segunda crítica, ainda mais severa, foi feita pelos geólogos questionando que a atmosfera da Terra jamais foi redutora (metano, amônia e hidrogênio), ao contrário, era oxidante (monóxido de carbono, dióxido de carbono, nitrogênio, hidrogênio) e neste tipo de atmosfera o rendimento obtido de aminoácidos era praticamente nulo. Quanto ao problema da diluição dos aminoácidos na água do mar, Bernal (1951) sugeriu que argilas e minerais poderiam adsorver os aminoácidos favorecendo a sua pré-concentração e a catalisação das reações para a formação de peptídeos. Existem muitos trabalhos mostrando a capacidade de adsorção de aminoácidos sobre argilas e minerais, assim como a capacidade destes materiais (argilas, areia, minerais) de catalisar reações para a formação de peptídeos. Entretanto, Zaia et al. (2002), Zaia (2004_b) e Zaia e Zaia (2006) têm levantado algumas dúvidas sobre a importância de argilas e areia na pré-concentração de aminoácidos. Quanto ao problema de a atmosfera ser oxidante, Kobayashi et al. (1998) irradiaram uma mistura de monóxido de carbono, nitrogênio e água com partículas de alta energia, que simulariam os raios cósmicos, e obtiveram uma mistura de diversos aminoácidos, na qual a glicina apresentou maior concentração. Muitos experimentos foram realizados utilizando como fonte de energia descargas elétricas ou radiação ultravioleta em atmosferas nem muito redutoras nem muito oxidantes e foram obtidos aminoácidos além de diversas biomoléculas ou precursores de biomoléculas. Portanto, podemos concluir que misturas gasosas podem ser uma fonte de aminoácidos.

Reações em Estado Sólido

Reações em estado sólido simulam ambientes, tais como lava de vulcão terrestre sendo resfriada ou lugares onde ocorreu o impacto de um cometa ou meteoro. Em ambos os casos, o calor é a fonte de energia para as reações químicas. Para a formação da ligação peptídica, é necessária a eliminação de uma molécula de água, assim, as reações entre aminoácidos, em estado sólido que não é em meio aquoso, são propícias para a formação

de peptídeos e proteínas. Diversos aminoácidos (alanina, ácido aspártico, ácido glutâmico etc.) foram obtidos quando a glicina foi aquecida a 240°C com manganês mais alumina (Ivanov e Slavcheva, 1977). Com relação à estabilidade dos aminoácidos, eles não sofrem decomposição em temperaturas abaixo de 270°C (Basiuk et al., 1998). Existem descritos na literatura diversos estudos mostrando que é possível a obtenção de peptídeos e, dependendo da composição da mistura de aminoácidos e da temperatura de reação, estes polímeros podem estar na faixa de peso molecular entre 5.000 e 25.000 Dáltons (Harada e Fox, 1960; Fouche Jr. e Rohlfing, 1976; Hartmann, 1981). Portanto, podemos concluir que estes ambientes podem ter sido fontes de aminoácidos, peptídeos e proteínas.

Reações em Ciclos de Hidratação e Desidratação

Reações em ciclos de hidratação (parte aquosa do ciclo) e desidratação (parte seca do ciclo) simulam ambientes do seguinte tipo: pelo efeito das chuvas ou marés (hidratação), pequenas lagoas, poças d'água ou mesmo lamaçais são formados e pelo efeito do calor do Sol (desidratação) a água é evaporada, podendo deixar estes lugares totalmente secos, depois de algum tempo novamente estas lagoas são formadas por chuvas ou marés e novamente pelo efeito do calor do Sol são secadas. Com este ambiente podemos obter peptídeos. Assim, utilizando microondas para aquecer uma mistura de aminoácidos (alanina, valina, glicina e ácido aspártico), submetida a 20 ciclos de hidratação e desidratação, foi possível a obtenção de peptídeos, cujo peso molecular variou de 1.000 a 4.000 Dáltons (Yanagawa et al., 1990) e mostraram alguma atividade catalítica, mas menor do que a de enzimas (Ito et al., 1990). Peptídeos também foram obtidos em ciclos de hidratação e desidratação quando aminoácidos foram dissolvidos em água com cloreto de sódio (simulando água do mar) e com cobre II, que é um dos mais abundantes metais de transição em água do mar (Rode e Schwendinger, 1990; Suwannhot e Rode, 1998; Plankensteiner et al., 2002). O fato de cloreto de sódio e cobre II catalisarem a reação de formação de peptídeos é algo muito relevante, pois são substâncias comuns e simples. A formação de peptídeos também foi obtida em ciclos usando argilas (Bujdák e Rode, 1999) e usando a combinação de argilas mais cloreto de sódio e cobre II (Rode et al., 1999). Pelos resultados experimentais mostrados até o momento, podemos concluir que ciclos de hidratação e desidratação foram importantes para a formação de peptídeos.

Reações em Solução Aquosa Aquecida a Altas Temperaturas e Pressões

Reações que ocorrem em solução aquosa aquecida a altas temperaturas e pressões simulam o ambiente primitivo devido a vulcões submarinos, em que a lava em contato com água do mar provoca seu superaquecimento. Este tipo de ambiente é muito estudado em química pré-biótica, por oferecer diversas vantagens, como as que seguem. Há quatro bilhões de anos, as moléculas no fundo do mar ficavam protegidas da destruição por radiação ultravioleta do nosso jovem Sol que emitia muito mais radiação ultravioleta que nos dias de hoje, além de não existir uma camada de ozônio para filtrar estes raios. A presença de elevada pressão e o superaquecimento, aos quais a água ficava submetida no fundo do mar e ficam até hoje, mudam a constante dielétrica, a densidade e a constante de dissociação da água, a qual passa a se comportar como um solvente orgânico, o que facilita em muito as reações de síntese de biomoléculas e biopolímeros. Conforme aumentamos a distância do centro do vulcão, diminuimos a temperatura da água; este gradiente de temperatura fornece ambientes para diferentes reações. Finalmente, silicatos, metais de transição e sais dissolvidos na água do mar podem catalisar as reações de formação de biomoléculas e biopolímeros. No entanto, os críticos deste tipo de ambiente têm levantado uma questão que devemos mencionar: segundo eles, o gradiente de temperatura praticamente não existia e as altas temperaturas destes ambientes (600°C) não produziam moléculas, mas sim as destruiriam. Apesar de toda esta controvérsia, de maneira geral a comunidade científica aceita estes ambientes como prováveis lugares para a síntese de biomoléculas e biopolímeros (Baross e Hoffman, 1985; Ferris, 1992; Shock, 1992). Utilizando estes ambientes (água aquecida a altas temperaturas e pressões), foi possível obter a síntese de diversos aminoácidos (Ferris, 1992; Alargov et al., 2002), peptídeos (Ferris, 1992; Ogata et al., 2000; Alargov et al., 2002) e estruturas esféricas que lembram as células modernas (Yanagawa e Kojima, 1985; Yanagawa e Kobayashi, 1989). Portanto, como podemos ver, este ambiente é muito rico em termos de compostos que podem ser sintetizados. Outro fato que devemos ressaltar é que para a formação de peptídeos não foi necessária, em muitos, casos a adição de nenhum tipo de catalisador.

Aminoácidos Extraterrestres

Algumas questões que podemos levantar sobre aminoácidos extraterrestres são: foram os meteoros e os cometas responsáveis pelos aminoácidos existentes em nosso pla-

neta?; onde foram produzidos estes aminoácidos?; poderiam sobreviver durante a viagem pelo vácuo e à radiação ultravioleta?; quando da chegada à Terra sobreviveriam ao aquecimento pela entrada na atmosfera e pelo impacto na superfície do nosso planeta? Com relação à primeira pergunta, com os dados que dispomos até o momento, podemos dizer que os aminoácidos extraterrestres podem ter sido uma das fontes de aminoácidos. Quanto à segunda e à terceira perguntas, não sabemos como e nem onde aminoácidos extraterrestres poderiam ser produzidos. A única evidência que temos da existência de aminoácidos fora do nosso planeta são aqueles encontrados em alguns tipos de meteoros. Murchison é o meteoro mais estudado, sendo que ele caiu na Austrália em 1969; neste meteoro já foram determinados cerca de 80 tipos diferentes de aminoácidos, incluindo 8 que normalmente são encontrados nos sistemas biológicos atuais, e também dipeptídeos de glicina (Shimoyama e Ogasawara, 2002; Rawls, 2001). Um estudo realizado por Boillot et al. (2002) sobre o comportamento de aminoácidos a bordo de uma missão na MIR no espaço mostrou que aminoácidos (L-leucina, L-metil-leucina) e tripeptídeos de leucina podem sobreviver ao efeito da radiação e do vácuo quando protegidos apropriadamente dentro do meteoro, sendo que uma capa de 5 µm de espessura foi suficiente para protegê-los da radiação ultravioleta e do alto vácuo do espaço exterior. Portanto, a partir destes dados experimentais e da presença de aminoácidos em meteoros caídos em nosso planeta, pode-se concluir que a sua sobrevivência à radiação e ao vácuo durante a viagem até a chegada ao nosso planeta não se constitui um problema. Quanto a nossa última pergunta, um experimento realizado por Blank et al. (2001), que simula a queda de um cometa mostrou que uma mistura de aminoácidos (lisina, norvalina, ácido aminobutírico, fenilalanina) quando submetida a um choque que equivaleu a uma variação de pressão e temperatura de 50.000-207.000 atmosferas e 139-597°C, respectivamente, durante um período de tempo que variou de 0,85 a 2,7 µs, cerca de 50% dos aminoácidos não foram decompostos e foram produzidos dipeptídeos. Portanto, a partir dos fatos experimentais acumulados até o momento podemos supor que a queda de cometas ou meteoros em nosso planeta pode ter sido uma fonte de aminoácidos e peptídeos.

Aminoácidos Levógiros (L)

Apesar de terem sido encontrados alguns poucos D-aminoácidos nos seres vivos superiores (Fujiin, 2002), podemos dizer que a maioria esmagadora de todos os aminoácidos que fazem parte dos seres vivos é de L-aminoácidos. Assim, a pergunta que surge é a seguinte:

qual ou quais foram os mecanismos que selecionaram somente os L-aminoácidos para constituírem todos os seres vivos que conhecemos? Existem muitas propostas de mecanismos que poderiam levar a um enriquecimento de um dos isômeros, porém até o momento nenhuma delas é definitiva. O quartzo (outros minerais também foram propostos) foi proposto como um mineral que poderia selecionar um dos enantiômeros, visto que o L-quartzo adsorve preferencialmente L-alanina 20% a mais do que D-alanina, porém até o momento não se encontrou na natureza maior quantidade de um dos isômeros do quartzo (Evgenii e Wolfram, 2000). Outro mecanismo proposto (experimentalmente possível) é o da maior decomposição de um dos isômeros de uma mistura racêmica de aminoácidos por luz L ou D circular ou elipticamente polarizada, porém existem diversas críticas, sendo a principal sobre a eficácia deste tipo de mecanismo no cosmos (Bonner et al., 1999_a; Bonner et al., 1999_b; Bonner e Bean, 2000). No entanto, devemos ressaltar que este tipo de mecanismo sugere que os isômeros-L dos aminoácidos foram enriquecidos no espaço e trazidos para Terra por cometas ou meteoros. Existem outros mecanismos propostos para a seleção de um dos isômeros de aminoácidos, todavia, como dissemos anteriormente, o assunto é muito controverso não existindo na comunidade científica consenso sobre qual deles poderia ter contribuído mais eficazmente para a seleção dos L-aminoácidos (Zaia e Zaia, 2005).

Dogma Central da Biologia Molecular

O DNA é o responsável pela síntese de RNA, que, por sua vez, é o responsável pela síntese de proteínas e algumas enzimas catalisam a síntese de DNA e RNA. Este fluxo de informação de DNA para RNA e para proteínas é chamado de dogma central da biologia molecular. A primeira pergunta que podemos colocar é: quem surgiu primeiro foi o DNA ou o RNA ou foram as proteínas? Acontece que o DNA é uma molécula bastante complexa em estrutura: ela é formada por dois filamentos complementares que correm de forma antiparalela. E cada filamento é composto por um grupamento fosfato, mais um açúcar (a desoxirribose), mais uma base nitrogenada – que pode ser a adenina, a timina, a citosina ou a guanina – repetidos inúmeras vezes. Uma molécula assim teria baixa probabilidade de ter sido a primeira “molécula viva” a surgir de maneira abiótica. Além disso, apesar de o DNA ser capaz de armazenar de forma eficiente um conjunto de informação que sirva para a produção de novas cópias de DNA semelhantes à original, ele não consegue realizar esta tarefa sozinho. É necessária a participação de RNAs e

de proteínas para que a informação nele contida se expresse e seja preservada nas moléculas-filhas de DNA. Isto torna mais improvável ainda sua participação inicial na origem da vida.

Embora as proteínas se mostrem extremamente versáteis, tendo sido as primeiras candidatas ao posto de primeira molécula viva, existe uma grande tendência (não pela totalidade) na comunidade científica em aceitar que o RNA é o mais primordial dos três polímeros. Isto decorre de algumas características interessantes do RNA, bem como de uma série de descobertas que foram acumulando-se ao longo dos anos. Em primeiro lugar, as moléculas de RNA são normalmente representadas por um único filamento, e não dois, como ocorre com o DNA, o que o torna um pouco mais simples e mais provável seu surgimento de maneira abiótica. Por outro lado, sua construção é bastante semelhante à do DNA, sendo formado pela repetição de um grupamento fosfato, um açúcar (neste caso a ribose) e uma base nitrogenada (adenina, citosina, guanina e uracila, esta última no lugar da timina comum ao DNA). Portanto, assim como o DNA, o RNA é capaz de guardar informação genética em sua sequência de nucleotídeos. Nas últimas décadas, uma série de estudos tem mostrado que o RNA também é uma molécula com múltiplas habilidades, dentro das células de procariotos e eucariotos, estando envolvido em diferentes processos bioquímicos essenciais (Joice, 2002). A capacidade catalítica de algumas moléculas de RNA é a mais significativa para o propósito de se tentar imaginar como se deu a origem das primeiras moléculas vivas. Estas moléculas especiais de RNAs, chamadas ribozimas, participam de diferentes processos bioquímicos, essenciais dentro das células, inclusive na síntese proteica que ocorre nos ribossomos de todos os organismos vivos. Portanto, moléculas de RNA também podem funcionar de maneira semelhante às proteínas, mais especificamente as enzimas. Logo, uma das vantagens de se imaginar o RNA como elemento primordial na origem da vida é que este pode combinar as funções de catalisador e de armazenador de informação em uma mesma molécula (Shapiro, 2006).

Contudo, a pergunta mais difícil de responder é: qual foi o segundo polímero que surgiu, foi o DNA ou foram as proteínas? Não há até o momento uma resposta satisfatória para esta pergunta (Freeland et al., 1999). Alguns experimentos sobre purinas e aminoácidos são interessantes e merecem um destaque. Sowerby et al. (2002) mostraram que quando a adenina e a xantina são adsorvidas sobre grafite, elas selecionam a adsorção de alguns aminoácidos, ou seja, este é um mecanismo simples de discriminação de aminoácidos feito por pré-

-RNA. Mellersh e Wilkinson (2000) demonstraram que quando ácido poliadenílico é imobilizado sobre sílica ele se liga a L-lisina de forma seletiva e facilita a formação da ligação amida. Portanto, existem algumas evidências de que o RNA pode ter importância para a seleção de alguns aminoácidos para posterior síntese de proteínas, todavia, estamos muito longe de responder nossa última pergunta: como estas moléculas (proteínas) foram incorporadas na atual bioquímica?

Panspermia

Estamos o tempo todo supondo que a vida começou em nosso planeta, mas e se a vida tivesse sido gerada em algum outro planeta e de alguma forma trazida para a Terra. O químico sueco S. Arrhenius foi um dos que propuseram que esporos poderiam ter semeado a vida em nosso planeta quando trazidos para cá por ventos solares. Hoje essa teoria é conhecida como panspermia. Isto é possível? Na verdade, não sabemos se isto ocorreu ou não, a única coisa que sabemos é que existem evidências experimentais que mostram que esporos podem sobreviver à radiação e ao vácuo. Contudo, a ideia de panspermia na verdade não resolve o problema de como iniciou a vida em nosso planeta, mas simplesmente transfere o problema para outro lugar (Horneck et al., 2001; Clark et al., 1999; Raulin-Cerceau et al., 1998).

Considerações Finais

A partir do texto acima podemos tirar algumas conclusões como segue. Aminoácidos e peptídeos foram provavelmente substâncias comuns na Terra primitiva, visto que essas substâncias são facilmente sintetizadas em diversos ambientes que existiram (alguns ainda existem) em nosso planeta. Como foi feita a seleção do isômero-L dos aminoácidos ainda não sabemos, visto que o assunto é ainda muito debatido pela comunidade científica. Finalmente, como se deu a incorporação da síntese de proteínas e a seleção dos monômeros para a formação de proteínas em nossa atual bioquímica é assunto de muito estudo e debate.

Referências

- Alargov, D.K.; Deguchi, S.; Tsjuii, K.; Horikoshi, K. Reaction behaviors of glycine under super and subcritical water conditions. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 32(1):1-12, 2002.
- Baross, J. A.; Hoffman, S.E. Submarine hydrothermal vents and associated gradient environments as sites for the origin and evolution of life. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 15(4):327-345, 1985.
- Basiuk, V.A.; Navarro-Gonzalez, R.; Basiuk, E. V. Behavior of amino acids when volatilized in the presence of sílica gel and pulverized basaltic lava. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 28(2):167-193, 1998.
- Bernal, J. D. *The Physical Basis of Life*, Routledge and Kegan Paul Ltd, London, 1951.
- Blank, J. G.; Miller, G. H.; Ahrens, M. J.; Winans, R.E. Experimental shock chemistry of aqueous amino acid solutions and the cometary delivery of prebiotic compound. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 31(1-2):15-51, 2001.
- Boilot, F.; Chabin, A.; Buré, C.; Venet, M.; Belsky, A.; Bertrand-Urbaniak, M.; Delmas, A.; Brack, A. Barbier, B. The perseus exobiology mission on MIR: behaviour of amino acids and peptides in earth orbit. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 32(4):359-385, 2002.
- Bonner, W. A.; Bean, D. B. Asymmetric photolysis with elliptically polarized light. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 30(6):513-517 2000.
- Bonner, A. W. ; Greenberg, J.M.; Rubenstein, E. The extraterrestrial origin of the homochirality of biomolecules-rebuttal to a critique. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 29(2):215-219, 1999a.
- Bonner, W.A.; Rubenstein, E.; Brown, G.H. Extraterrestrial handedness: a reply. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 29(3):329-332, 1999b.
- Bujdák, J.; Rode, B.M. Sílica, alumina and clay catalyzed peptide bond formation: enhanced efficiency of alumina catalyst. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 29(5):451-461, 1999.
- Clark, B.C.; Baker, A.L.; Cheng, A.F.; Clemett, S.J.; McKay, D.; Mccween, H.Y.; Pieters, C.M.; Thomas, P.; Zolensky, M. Survival of life on asteroids, comets and other small bodies. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 29(5):521-545, 1999.
- Evgenii, K.; Wolfram, T. The role of quartz in the origin of optical activity on earth. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 30(5):431-434, 2000.
- Ferris, J.P. Chemical markers of prebiotic chemistry in hydrothermal systems. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 22(1-4):109-134, 1992.
- Fouche Jr. C.E.; Rohlfling, D.L. Thermal polymerization of amino acids under various atmospheres or at low pressures. *BioSystems*, 8(2):57-65, 1976.
- Freeland, S.J.; Knight, R.D.; Landweber, L.F. Do proteins predate DNA? *Science*, 286(5440):690-692, 1999.
- Fujii, N. D-amino acids in living higher organisms. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 32(2):103-127, 2002.
- Harada, K.; Fox, S.W. The thermal copolymerization of aspartic acid and glutamic acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, 86:274-280, 1960.
- Hartmann, J.; Brand, M.C.; Dose, K. Formation of specific amino acid sequences during thermal polymerization of amino acids. *Biosystems*, 13(3):141-147, 1981.

- Horneck, G.; Rettberg, P.; Reitz, G.; Wehner, J.; Eschweiler, U.; Strauch, K.; Panitz, C.; Starke, V.; Baumstark-Khan, C. Protection of bacterial spores in space, a contribution to the discussion on panspermia. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 31(6):527-541, 2001.
- Ito, M.; Handa, N.; Yanagawa, H. Synthesis of polypeptides by microwave heating. II. Function of polypeptides synthesized during repeated hydration-dehydration cycles. *J. Mol. Evolut.*, 31:187-194, 1990.
- Ivanov, C. P.; Slavcheva, N.N. Formation of amino acids on heating glycine with alumina. *Orig. Life*, 8(1):13-19, 1977.
- Joyce, G.F. The antiquity of RNA-based evolution. *Nature*, 418(6894):214-221, 2002.
- Kenyon, D. H.; Steinman, G.D. *Biochemical Predestination*. McGraw, New York, 1969.
- Kobayashi, K.; Kaneko, T.; Saito, T.; Oshima, T. Amino acids formation in gas mixtures by higher energy particle irradiation. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 28(2):155-165, 1998.
- Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Princípios de Bioquímica*. 2ª ed., Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda, São Paulo, 2000.
- Mellersh, A.; Wilkinson, A.S. RNA bound to solid phase can select an amino acid and facilitate subsequent amide bond formation. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 30(1):3-7, 2000.
- Miller, S.L. A production of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science*, 117(3046):528-529, 1953.
- Ogata, Y.; Imai, E.; Honda, H.; Hatori, K.; Matsuno, K. Hydrothermal circulation of seawater through hot vents and contribution of interface chemistry to prebiotic synthesis. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 30(6):527-537, 2000.
- Plankensteiner, K.; Righi, A.; Rode, B.M. Glycine and diglycine as possible catalytic factors in the prebiotic evolution of peptides. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 32(3):225-236, 2002.
- Raulin-Cerceau, F.; Maurel, M.C.; Schneider, J. From panspermia to bioastronomy, the evolution of the hypothesis of universal life. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 28(4-6):597-612, 1998.
- Rawls, R.L. Amino acids dreams: astrochemistry puzzle over why these key molecules of life are abundant only on earth. *Chemical & Engineering News*, 7:45-51, 2001.
- Rode, B.M.; Schwendinger, M.G. Copper-catalyzed amino acid condensation in water. A simple possible way of prebiotic peptide formation. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 20:401-410, 1990.
- Rode, B.M.; Son, H.L.; Suwannachot, Y.; Bujdák, J. The combination of salt induced peptide formation reaction and clay catalysis: a way to higher peptides under primitive earth conditions. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 29(3):273-286, 1999.
- Shapiro, R. Small molecule interactions were central to the origin of life. *The Quarterly Review of Biology*, 81(2):105-125, 2006.
- Shimoyama, A.; Ogasawara, R. Dipeptides and diketopiperazines in the Yamato-791198 and Murchison carbonaceous chondrites. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 32(2):165-179, 2002.
- Shinitzky, M.; Nudelman, F.; Barda, Y.; Haimovitz, R.; Chen, E.; Deamer, D.W. Unexpected differences between D- and L-tyrosine lead to chiral enhancement in racemic mixtures. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 32(4):285-297, 2002.
- Shock, E.L. Chemical environments of submarine hydrothermal systems. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 22(1-4):67-107, 1992.
- Sowerby, S.J.; Petersen, G.B.; Holm, N.G. Primordial coding of amino acids by adsorbed purine bases. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 32(1):35-46, 2002.
- Suwannachot, Y.; Rode, B.M. Catalysis of dialanine formation by glycine in the salt-induced peptide formation reaction. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 28(1):79-90, 1998.
- Yanagawa, H.; Kobayashi, K. Formation of amino acids, peptide like polymers, and microspheres in superheated hydrothermal environments. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 19:540-541, 1989.
- Yanagawa, H. e Kojima, K. Thermophilic microspheres of peptides like polymers and silicates formed at 250°C. *J. Biochemistry*, 97(5):1521-1524, 1985.
- Yanagawa, H.; Kojima, K.; Handa, N.; Ito, M. Synthesis of polypeptides by microwave heating. I. Formation of polypeptides during repeated hydration-dehydration cycles and their characterization. *J. Mol. Evol.*, 31(3):180-186, 1990.
- Zaia, D.A.M.; Zaia, C.T.B.V. Adsorção de aminoácidos sobre minerais e a origem da vida. *Química Nova* 29:786-789, 2006.
- Zaia, D.A.M.; Zaia, C.T.B.V. Os cristais e a origem da vida: a seleção quiral de aminoácidos na Terra primitiva. *Ciência Hoje* 37:38-43, 2005.
- Zaia, D.A.M. A origem da vida e a química prebiótica. *Semina* 25:3-8, 2004.
- Zaia, D.A.M. A review of adsorption of amino acids on minerals: was it important for origin of life? *Amino Acids* 27(1):113-118, 2004.
- Zaia, D.A.M. Da geração espontânea à química prebiótica. *Química Nova*, 26:260-264, 2003.
- Zaia, D.A.M.; Vieira, H.J. e Zaia, C.T.B.V. Adsorption of L-amino acids on sea sand. *J. Braz. Chem. Soc.*, 13:679-681, 2002.
- Zaia, D.A.M. A busca de vida extraterrestre: uma grande aventura científica. *Ciência Hoje*, 30:20-27, 2001.

17. Estrutura e Propriedades das Proteínas

Rosemari Otton
Rozangela Verlengia
Rui Curi
Moacir Carnelós Filho

Introdução

A palavra proteína introduzida pelo pesquisador Jons J. Berzelius em 1838 tem origem grega e significa “de primeira classe”, para salientar a importância desta classe de moléculas aos organismos vivos. As proteínas exercem papéis cruciais em, virtualmente, todos os processos biológicos, tais como catálise enzimática, transporte e armazenamento, movimento coordenado, sustentação mecânica, proteção imunitária, geração e transmissão de impulsos nervosos e controle do crescimento e da diferenciação celular.

As proteínas são formadas por cadeias não ramificadas de aminoácidos, que são as unidades estruturais básicas desta classe de moléculas. É notável que todos os diferentes tipos de proteínas sejam sintetizados como polímeros de apenas 20 aminoácidos. Esses aminoácidos são definidos como aqueles para os quais existe pelo menos um códon específico no genoma. Os aminoácidos formam ligações peptídicas entre si (Fig. 17.1) as quais são covalentes entre o átomo de carbono do grupo carboxílico de um aminoácido e o átomo de nitrogênio do grupo amina do aminoácido subsequente. Como subproduto desta reação, há a formação de moléculas de água, resultantes de uma hidroxila do grupo carboxila e um hidrogênio do grupo amina. A molécula resultante da simples ligação entre aminoácidos é denominada peptídeo, e os aminoáci-

dos agora recebem o nome de resíduos. Esta reação jamais ocorre na célula. A união dos aminoácidos por ligação peptídica não é feita por reação direta entre eles, mas por meio de um complexo aparato de síntese proteica que inclui ribossomos, ácidos ribonucleicos, várias proteínas e enzimas no processo conhecido como tradução.

Uma das características das proteínas é possuírem estruturas tridimensionais bem definidas. Um polipeptídeo linear não apresenta atividade biológica, que surge apenas quando este ganha sua conformação tridimensional. A estrutura de proteínas é geralmente descrita como tendo quatro níveis. As estruturas primária, secundária e terciária referem-se às moléculas de cadeia simples, enquanto a estrutura quaternária se refere a um nível em que ocorre interação de cadeias polipeptídicas que se agrupam.

Estrutura Primária

A estrutura primária de uma proteína é formada pela sequência linear de resíduos de aminoácidos (Fig. 17.2) e por pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína. A estrutura primária pode variar em número, sequência e tipo de aminoácidos. É a estrutura primária singular, que permite que uma cadeia polipeptídica se dobre em uma estrutura tridimensional específica, que dá à proteína suas propriedades químicas e fisiológicas.

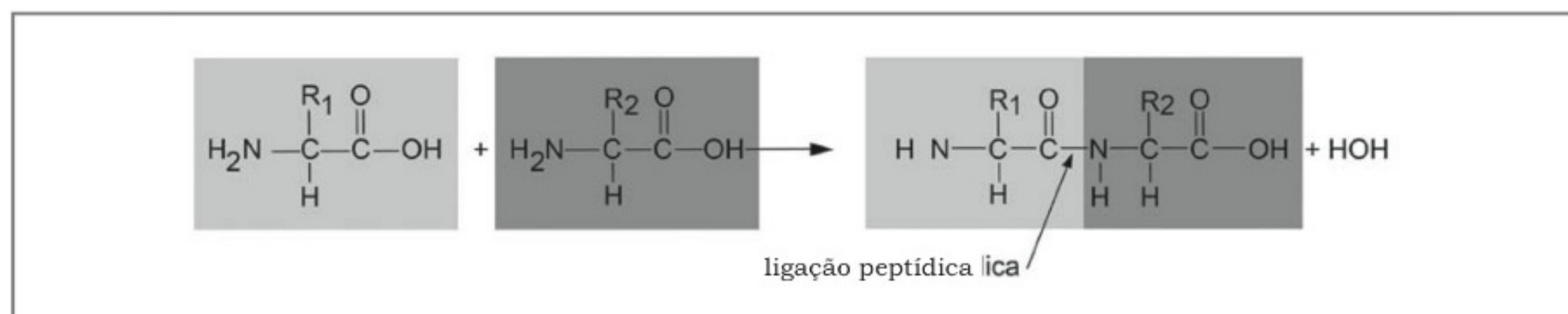


Figura 17.1 – Formação de uma ligação peptídica entre aminoácidos.

Estrutura Secundária

É o arranjo regular dos aminoácidos dentro de determinadas regiões do polipeptídeo. Os dois principais tipos de estruturas secundárias periódicas são as alfa-hélice (α -*helix*) e a folha beta-pregueada (β -*sheet*) (Fig. 17.3), as quais foram primeiramente propostas por Linus Pauling e Robert Corey em 1951. A alfa-hélice é formada principalmente por pontes de hidrogênio. As cadeias laterais dos resíduos ficam dispostas do lado de fora da hélice. O principal componente da folha beta é a fita beta, uma sequência de 5 a 10 resíduos com extensão variável. Há três possibilidades de composição de folhas beta a partir de pontes de hidrogênio entre as fitas beta: folha beta paralela, com as fitas seguindo o mesmo sentido aminocarboxiterminal, folha beta antiparalela, com as fitas em sentidos opostos, ou ainda uma mistura das duas anteriores. Além destes dois tipos principais, encontramos também os *beta-turn*, sequências de 4 resíduos que possibilitam uma volta de 180° na estrutura da molécula, as alças,

regiões não estruturadas encontradas entre os elementos regulares e, finalmente, os braços terminais, nas regiões N-terminal e C-terminal. Certos arranjos de estruturas secundárias consecutivas são chamados de estruturas supersecundárias ou motivos (domínio).

Estrutura Terciária

A estrutura terciária de uma proteína é o padrão tridimensional do dobramento (*folding*) da molécula. É comum encontrarmos proteínas com função similar com estruturas primárias diferentes, porém com estruturas terciárias semelhantes. A estrutura terciária pode ser vista como o “empacotamento” dos elementos da estrutura secundária. Com frequência, observamos padrões recorrentes de organização das estruturas secundárias. Chamamos estes padrões de motivos ou domínios. Os domínios mais comuns são somente hélices ou folhas beta, hélice-alça-hélice, *beta-turn-beta*, *beta-alfa-beta*. Domínios são associações de estruturas

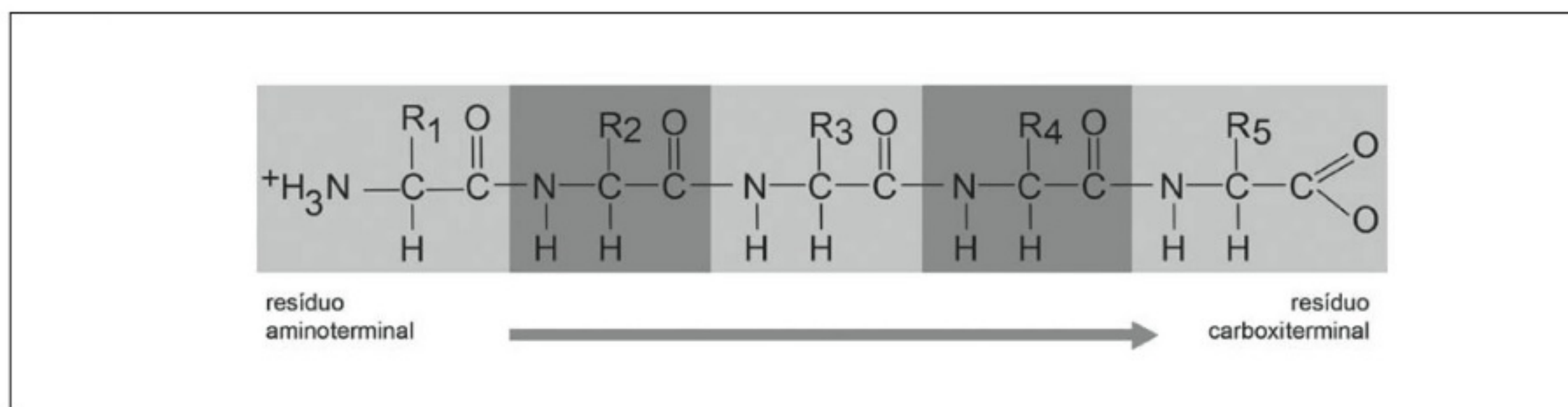


Figura 17.2 – Estrutura primária de uma proteína.

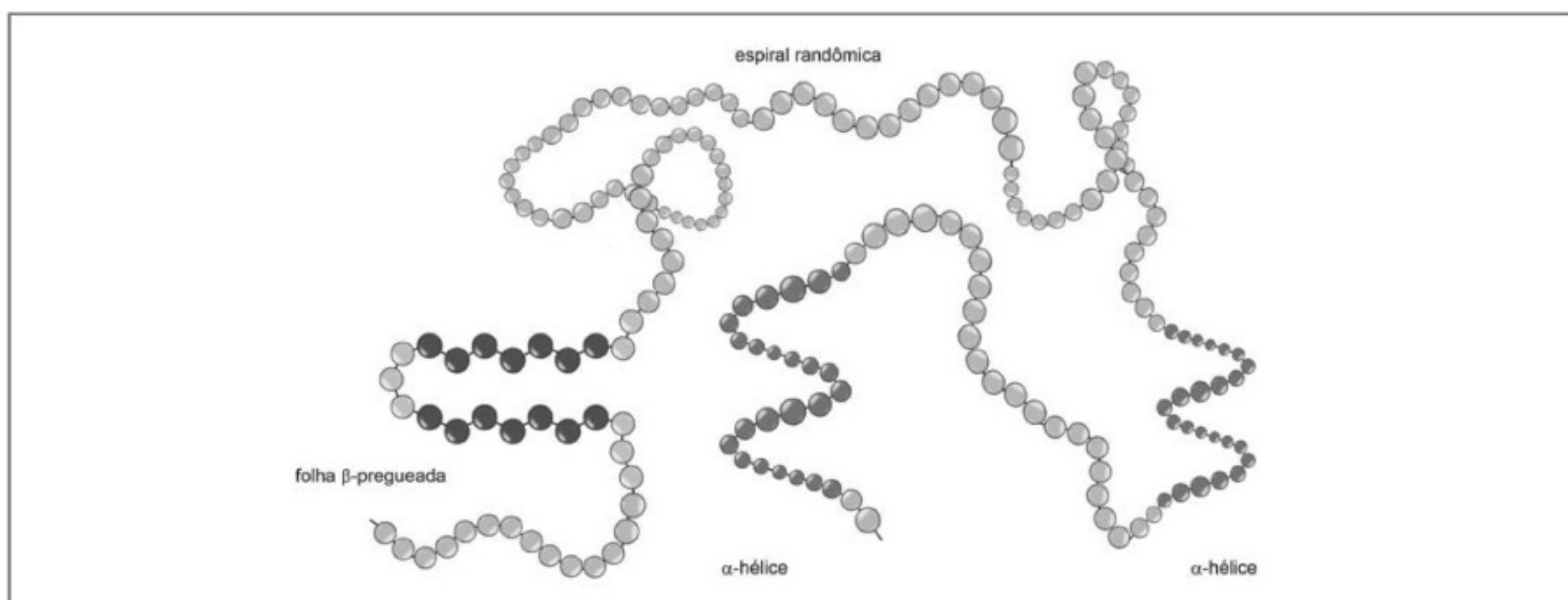


Figura 17.3 – Estruturas secundárias das proteínas. Os tipos mais comuns de estruturas secundárias são as alfa-hélice e as folhas β -pregueada. Na alfa-hélice, pontes de hidrogênio são formadas entre grupos CO e NH das ligações peptídicas, separadas por quatro resíduos de aminoácidos. Na folha β -pregueada, pontes de hidrogênio conectam duas partes de uma cadeia polipeptídica estendidas lado a lado. As cadeias laterais dos aminoácidos não são mostradas.

secundárias. Os domínios podem ser considerados unidades conectadas que podem variar em sua estrutura, função e dobramento. Cada domínio pode ser caracterizado pelo seu dobramento. Enquanto algumas proteínas apresentam um único domínio, outras podem ter vários. Estes domínios podem ser definidos como as regiões de interação e atividade da proteína, cabendo ao restante da molécula uma função mais estrutural.

Um determinante crítico da estrutura terciária é a localização dos aminoácidos hidrofóbicos no interior da proteína e dos aminoácidos hidrofílicos na superfície, onde interagem com a água. Assim, o interior das proteínas dobradas consiste, principalmente, em mais aminoácidos hidrofóbicos, arranjados em alfa-hélices e em folhas beta-pregueadas; essas estruturas secundárias são encontradas nos núcleos hidrofóbicos das proteínas porque as ligações dos hidrogênios neutralizam o caráter polar dos grupos CO e NH da estrutura do polipeptídeo. As regiões de alças que conectam os elementos da estrutura secundária são encontradas na superfície das proteínas dobradas, nas quais os componentes polares das ligações peptídicas formam pontes de hidrogênio com água ou com cadeias laterais polares de aminoácidos hidrofílicos. Interações entre cadeias laterais de aminoácidos polares (pontes de hidrogênio e iônicas) na superfície da proteína também são determinantes importantes da estrutura terciária. Além disso, as ligações dissulfeto covalentes entre os grupos sulfidril dos resíduos de cisteína estabilizam as estruturas dobradas de várias proteínas de superfície celular ou secretadas.

Estrutura Quaternária

Há proteínas que apresentam um nível adicional de organização na sua estrutura, dispondo duas ou mais subunidades de cadeias polipeptídicas em um arranjo espacial característico. Estas subunidades podem ser idênticas ou não. Estas proteínas normalmente só adquirem funcionalidade quando todas as subunidades estão agrupadas. A estrutura quaternária é mantida por ligações não covalentes entre as subunidades, dos mesmos tipos que mantêm a estrutura terciária das proteínas.

Os estudos da conformação, da função e da evolução das proteínas revelaram a importância de um nível de organização estrutural distinto dos descritos acima (Fig. 17.4). Esse é o **domínio proteico**, que é o resultado de qualquer parte da cadeia polipeptídica que pode se enovelar, independentemente para formar uma estrutura compacta e estável. Um domínio proteico contém geralmente entre 40 e 350 resíduos de aminoácidos, sendo a unidade modular da qual muitas proteínas são

construídas. Os diferentes domínios de uma proteína geralmente estão associados a várias funções. Um exemplo bem estudado de domínio proteico encontra-se na proteína Src envolvida na transmissão de sinais no interior das células. Esta proteína possui domínios SH2 e SH3, que desempenham funções reguladoras na proteína e outros dois domínios com funções catalíticas. As menores moléculas de proteínas contêm apenas um domínio, enquanto as proteínas maiores contêm dezenas de domínios, geralmente conectados uns aos outros por segmentos relativamente pouco estruturados de cadeia polipeptídica.

Para ser útil à célula, a cadeia polipeptídica recém-sintetizada deve dobrar-se, adquirindo sua conformação tridimensional característica, ligar-se a alguma pequena molécula do cofator necessária para sua atividade, ser apropriadamente modificada por proteinoquinasas ou outras enzimas modificadoras de proteínas e associar-se corretamente com outras subunidades proteicas com as quais ela funcione. Quando uma proteína se dobra formando uma estrutura compacta, ela esconde a maioria dos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos na região central. Além disso, muitas interações não covalentes se formam entre as várias partes da molécula. É a soma de todos esses arranjos energeticamente favoráveis que determina o padrão de dobramento final da cadeia polipeptídica – como a conformação de menor energia livre. Anos de evolução selecionaram proteínas que rapidamente adquirem seu dobramento conforme a extremidade N-terminal da sua cadeia polipeptídica emerge do ribossomo.

O dobramento ou enovelamento de uma proteína é feito de forma mais eficiente por uma classe especial de proteínas denominadas de chaperonas moleculares, cis-trans-prolil isomerases e proteína dissulfeto isomerase.

As chaperonas moleculares estão incluídas entre as proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*-HSP), pois são sintetizadas em quantidades elevadas em situações em que as células são expostas a temperaturas acima de 37°C (42°C). Este fato reflete a operação de um sistema de retroalimentação que responde a qualquer aumento de proteínas erroneamente dobradas (tais como aquelas produzidas por temperaturas elevadas), incentivando a síntese das chaperonas, as quais auxiliam essas proteínas a se redobram. As chaperonas não alteram o resultado final do processo de dobramento, mas impedem a formação de intermediários meta-estáveis ou não produtivos. Elas também aumentam a velocidade do processo de enovelamento por limitarem o número de vias de enovelamento não produtivas disponíveis a um polipeptídeo.

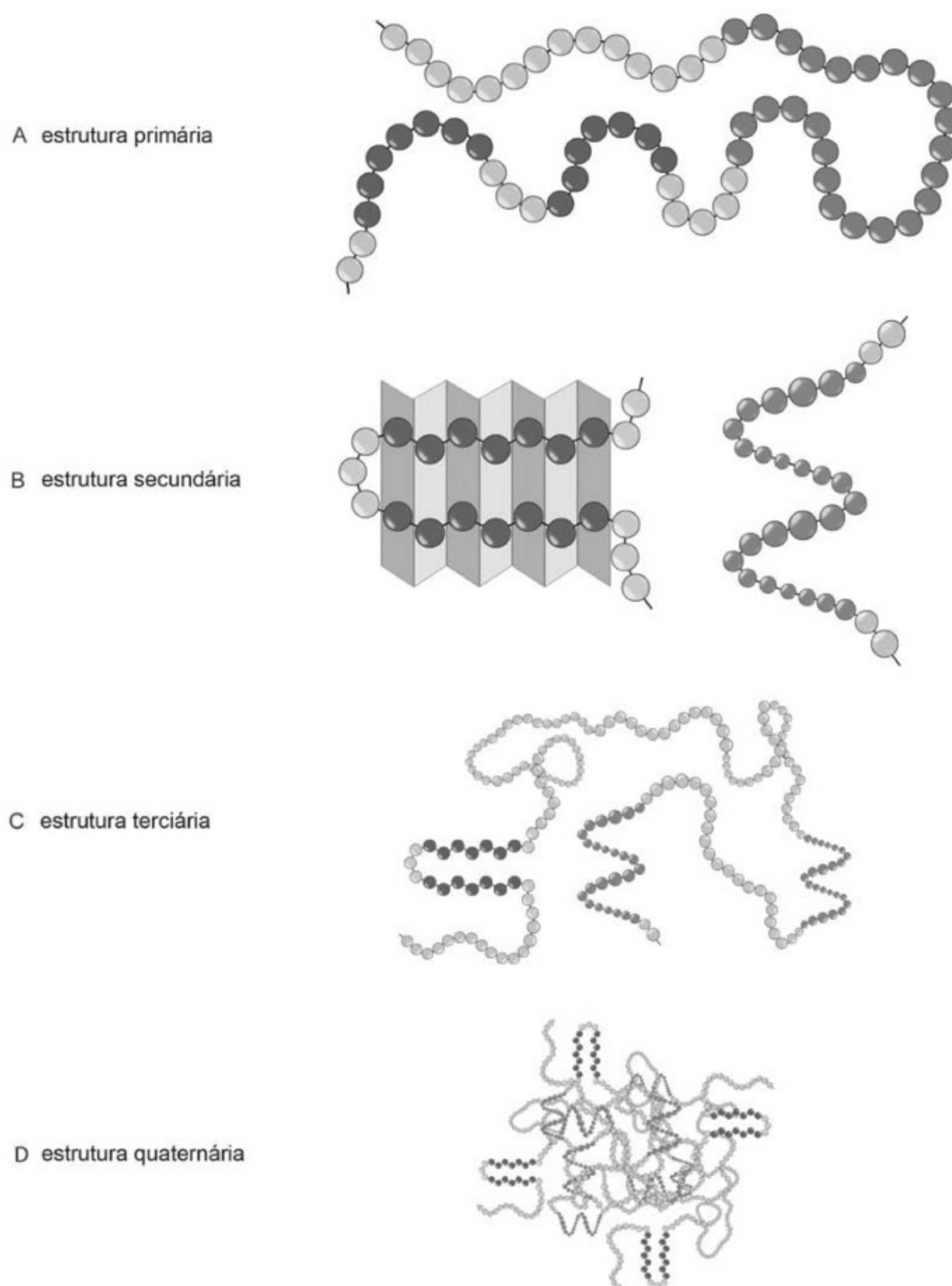


Figura 17.4 – Níveis estruturais de uma proteína. **(A)** Estrutura primária das proteínas – sequência linear de aminoácidos unidos entre si por ligações peptídicas. **(B)** Estrutura secundária – arranjos regulares (alfa-hélice e folha beta-pregueada) dos aminoácidos dentro de determinadas regiões dos polipetídeos. **(C)** Estrutura terciária – formação dos domínios por meio das combinações de alfa-hélice e folha beta-pregueada conectadas por regiões de alças da cadeia polipeptídica que dobras em estruturas globulares – domínios. **(D)** Estrutura quaternária – interações entre cadeias polipeptídicas diferentes em proteínas compostas por mais de um polipeptídeo.

Nas células eucarióticas, existem pelo menos duas famílias de chaperonas moleculares – conhecidas como HSP60 ou chaperoninas e HSP70 (Fig. 17.5). Diferentes membros desta família funcionam em várias organelas, por exemplo, a chaperona HSP70 conhecida como BiP ajuda as proteínas a se dobrarem no retículo endoplasmático. As duas famílias de chaperonas compartilham uma afinidade por pequenas áreas hidrofóbicas expostas nas proteínas dobradas de forma incompleta e hidrolisam ATP, geralmente ligando e liberando suas proteínas em um ciclo de hidrólise de ATP. Entretanto, em alguns processos estas proteínas funcionam de forma diferente. A HSP70 age precocemente na vida de muitas proteínas, ligando-se a uma fita de aproximadamente sete aminoácidos hidrofóbicos, antes de as proteínas deixarem os ribossomos. Em contraste, as proteínas HSP60 formam uma grande estrutura em forma de barril, que atua tardiamente na vida da proteína, após esta ter sido totalmente sintetizada. Este tipo de chaperona forma uma câmara de isolamento no interior da qual as proteínas com dobramentos errados são mantidas, evitando sua agregação e fornecendo a elas um ambiente favorável, no qual possam tentar um novo dobramento.

Uma proteína que tem uma área considerável de aminoácidos hidrofóbicos expostos na sua superfície é, geralmente, anormal: ou houve falha no dobramento correto após ter deixado o ribossomo, ou sofreu alteração, em um dado momento, que a desdobrou parcialmente, ou houve falha na associação de uma subunidade similar normal para a formação de um complexo proteico maior. Tal proteína, além de não ser funcional, pode ser também muito danosa para a célula. Regiões hidrofóbicas expostas de

forma inadequada nas proteínas levam à formação de agregados, que, por sua vez, causam precipitação. Estes agregados podem provocar doenças humanas graves. No entanto, na grande maioria das células, os mecanismos eficientes de controle de qualidade de proteínas evitam tais desastres. As chaperonas moleculares citadas anteriormente se ligam às regiões hidrofóbicas da proteína defeituosa, dando uma outra chance ao dobramento.

Contudo, se a tentativa de redobramento falhar, um novo mecanismo é acionado, agora para destruir completamente a proteína defeituosa. A via proteolítica inicia com o reconhecimento de uma região hidrofóbica anormal na superfície da proteína e finaliza com a entrega da proteína a um complexo de protease conhecido como proteossomo.

As cis-trans-prolil isomerases interconvertem ligações peptídicas cis e trans de resíduos de prolina e aumentam a velocidade de enovelamento. Isso permite que a conformação correta da ligação peptídica seja formada para cada prolina, como exigido pela estrutura enovelada nativa.

As proteínas dissulfeto isomerases catalisam a quebra e a formação de pontes de dissulfeto de cisteína, de modo que as ligações incorretas não sejam estabilizadas e o arranjo correto das ligações da cistina para a conformação enovelada seja rapidamente atingido.

Vias Proteicas

Após sua síntese nos ribossomos, as proteínas devidamente enoveladas e já com sua forma tridimensional

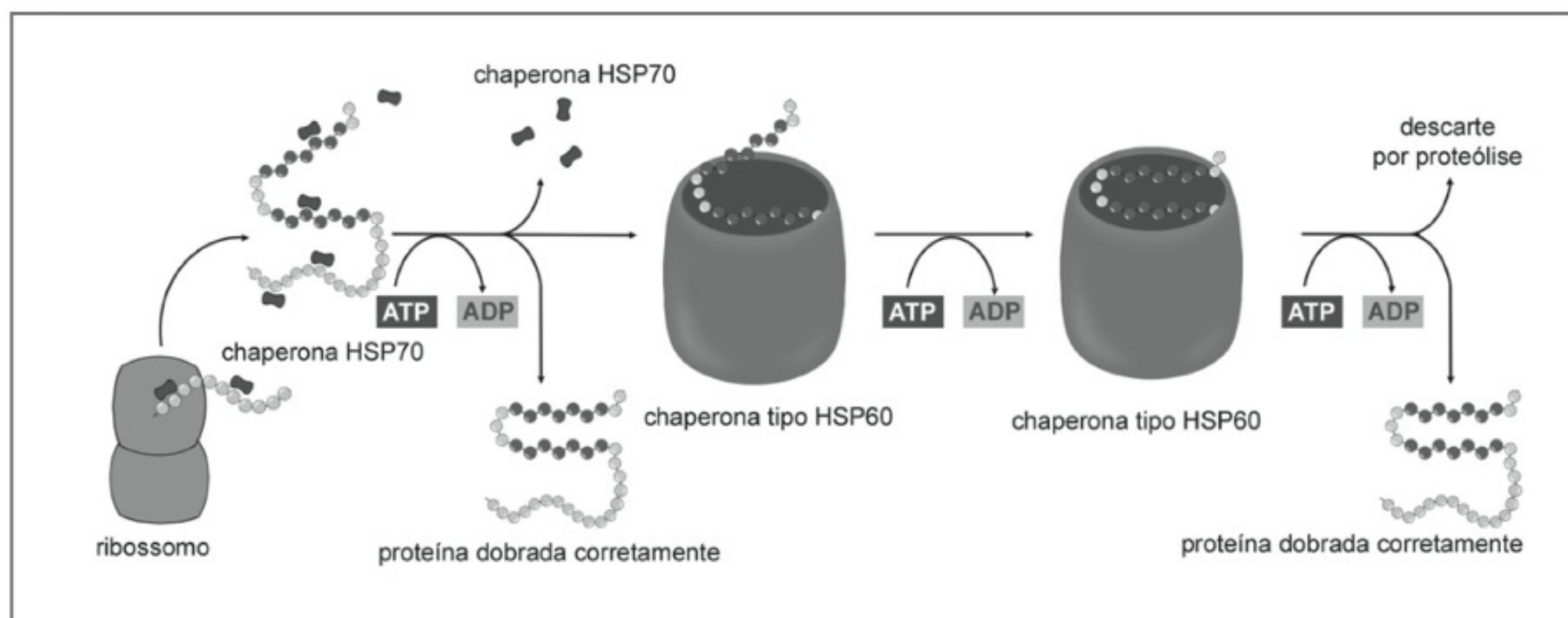


Figura 17.5 – Estrutura e função das famílias de chaperonas moleculares HSP60 e 70. A representação mostra a chaperona HSP70 atuando em fases iniciais do dobramento das proteínas ainda ligadas ao ribossomo e em fases mais avançadas do processo quando a HSP60 atua em proteínas incorretamente dobradas.

podem seguir diferentes vias no interior da célula. Este destino final depende da sua sequência de aminoácidos, a qual pode ou não conter sinais de endereçamento que direcionam seu envio a locais fora do citosol. A maioria das proteínas não contém um sinal de endereçamento e, conseqüentemente, permanece no citosol no qual desempenha sua função. No entanto, muitas proteínas têm sinais de endereçamento específicos, que direcionam seu transporte do citosol ao núcleo, ao retículo endoplasmático (RE), às mitocôndrias, aos plastídeos ou aos peroxissomos: os sinais de endereçamento também podem orientar o transporte de proteínas do RE a outros destinos na célula.

O RE captura proteínas selecionadas do citosol tão logo elas são sintetizadas. Essas proteínas podem ser de dois tipos: as proteínas transmembrana, que são transportadas somente parcialmente através das membranas do RE e tornam-se parcialmente embebidas nele, e as proteínas hidrossolúveis, que são translocadas completamente através das membranas do RE e liberadas em seu lúmen. Algumas das proteínas transmembrana atuam no RE, mas muitas são destinadas a residir na membrana plasmática ou na membrana de outra organela. As proteínas hidrossolúveis são destinadas tanto para o lúmen de uma organela quanto para a secreção. Todas essas proteínas, independentemente de seu destino subsequente, são direcionadas à membrana do RE pelo mesmo tipo de sequência sinalizadora e transportadas através da membrana por mecanismos semelhantes.

Existem pelo menos dois tipos de sinais de endereçamento em proteínas. Um deles é baseado em extensão contínua de sequência de aminoácidos, tipicamente com 15 a 60 resíduos de comprimento. Algumas dessas sequências sinalizadoras são removidas da proteína sintetizada por ação de peptidases de sinal específicas, uma vez que o processo de endereçamento tenha sido completado. O outro tipo consiste de um arranjo específico tridimensional de átomos na superfície proteica, que é formado quando a proteína é enovelada. Os resíduos de aminoácidos que compreendem esta região sinalizadora podem estar distantes uns dos outros na sequência linear de aminoácidos e geralmente persistem na proteína madura.

Cada sequência sinalizadora especifica um destino particular na célula. As proteínas destinadas para a transferência ao RE geralmente possuem uma sequência na sua região N-terminal, a qual inclui, como característica, uma sequência composta de cerca de 5 a 10 aminoácidos hidrofóbicos. Muitas destas proteínas passarão do RE ao aparelho de Golgi, mas aquelas com uma sequência espe-

cífica de quatro aminoácidos na sua região C-terminal são reconhecidas como residentes no RE e retornam a este.

Ambos os tipos de sinais de endereçamento são reconhecidos por receptores de endereçamento que guiam as proteínas ao destino apropriado, onde os receptores descarregam sua carga. Os receptores funcionam cataliticamente: depois de completada sua meta, eles retornam ao seu ponto de origem para ser reutilizados.

Muitas das proteínas no lúmen do RE estão em trânsito, na vias para outros destinos; outras, entretanto, lá residem normalmente e estão presentes em altas concentrações. Essas proteínas residentes no RE contêm um sinal de retenção no RE de quatro aminoácidos na sua região C-terminal, que são responsáveis pela retenção da proteína no RE. Algumas dessas proteínas atuam cataliticamente para auxiliar as muitas proteínas que são transportadas para o RE a enovelar-se e montarem-se corretamente. Exemplos de proteínas residentes no RE são a PDI (proteína dissulfeto isomerase), que catalisa a oxidação de grupos sulfidríla livres nas cisteínas para formar pontes dissulfeto (S-S) e a proteína BiP, uma chaperona, que atua nos processos pós-traducionais de proteínas no RE através dos transportadores do RE.

A maioria das proteínas solúveis e das ligadas à membrana que são sintetizadas no RE, incluindo aquelas destinadas ao transporte ao aparelho de Golgi, aos lisossomos, à membrana plasmática ou ao espaço extracelular, recebem a adição covalente de açúcares (glicosilação proteica), sendo esta uma das principais funções biossintéticas do RE. Em contraste, pouquíssimas proteínas no citosol são glicosiladas, e aquelas que o são portam uma modificação muito mais simples de açúcar, na qual um único grupo N-actilglicosamina é adicionado a um resíduo de serina ou treonina da proteína.

O processo de glicosilação envolve a transferência em bloco para proteínas presentes no RE, de um oligossacarídeo pré-formado, constituído de N-acetilglicosamina, manose e glicose, totalizando um bloco de 14 açúcares. Esse oligossacarídeo é transferido ao grupo NH_2 da cadeia lateral de um aminoácido asparagina na proteína, por isso é dito ligado à asparagina ou N-ligado. Os oligossacarídeos N-ligados são de longe os mais comuns encontrados nas glicoproteínas. Menos frequentemente, os oligossacarídeos são ligados ao grupo hidroxila na cadeia lateral do aminoácido serina, treonina ou hidroxilisina (oligossacarídeos O-ligados).

A glicosilação é uma modificação comum das proteínas que entram no RE, e uma observação importante foi a de que algumas proteínas necessitam da glicosilação

N-ligada para que ocorra seu enovelamento adequado no RE, ainda que a localização precisa dos oligossacarídeos aderidos à proteína não seja necessária. As chaperonas calnexina e calreticulina presentes no RE, reconhecem e ligam-se aos oligossacarídeos N-ligados às proteínas incompletamente enoveladas e as retêm no RE e os oligossacarídeos são removidos. Dessa forma, impedem que as proteínas enoveladas incompletamente sofram agregação irreversível.

Apesar de todo o auxílio das chaperonas, muitas moléculas proteicas (mais de 80% em algumas proteínas) transportadas para o RE falham na tentativa de alcançar seu enovelamento adequado ou seu estado oligomérico. Tais proteínas são transportadas de volta do RE para o citosol, no qual são degradadas. Uma vez que as proteínas mal enoveladas tenham alcançado o citosol, seus oligossacarídeos são removidos. Após este processo que envolve a ação de enzimas específicas, o polipeptídeo desglicosilado é rapidamente ubiquitinizado pelas enzimas conjugadas à ubiquitina ligadas ao RE e é então enviado aos proteossomos, no qual será degradado.

Referências

- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D. *Molecular Biology of the Cell*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor; New York: 1997, pp. 1294.
- Bukau, B.; Horwick, A.L. The Hsp70 and Hsp 60 chaperone machines. *Cell*, 92(3):351-354, 1998.
- Cooper, G.M. A química das células. In: (ed.) *A Célula – um Abordagem Molecular*. Cooper, G.M. 1ª. Reimpressão. ARTMED® Editora S.A.; Porto Alegre, p. 65-111, 2002.
- Dinner, A.R.; Sali, A.; Smith, L.J.; Dobson, C.M.; Karplus M. Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment. *Trends Biochem. Sci.* 25:331-339, 2000.
- Dookittle, R.F. The multiplicity of domains in proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 64:287, 1995.
- Hames, B.D.; Hames, B.D.; Rickwood, D. *Gel Eletroforesis: A Pratical Approach*. 2nd ed. New York: IRL Press; 1990. p.382.
- Orengo, C.A.; Thornton J.M. Protein families and their evolution—a structural perspective *Annu Rev Bioche.*; 74: 867-900, 2005.
- Pauling, L.; Corey, R.B.; Branson, H.R. The structure of proteins: two hydrogen bonded configuration of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 37(4):205-211, 1951.
- Schultz, R.M.; Liebman M.N. Proteínas I: composição e estrutura. In: (eds) Devlin, T.M.. *Manual de Bioquímica com correlações clínicas.*, , Editora Edgard Blucher Ltda; 2003 p.81-139.
- <http://www.sdsc.edu/restools/> Um compêndio de ferramentas e recursos eletrônicos acessíveis pela Internet.
- <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/cath/> Uma classificação estrutural de proteínas.

18. Manipulando as Proteínas *In Vitro*

Rosemari Otton
Rozangela Verlengia
Rosario Dominguez Crespo Hirata
Mário Hiroyuki Hirata

Introdução

A estrutura de uma proteína é determinada primeiramente pela sequência dos aminoácidos que a compõe. Os aminoácidos, por sua vez, são classificados pelo tipo de cadeia lateral variável ligada ao carbono alfa. Em pH neutro, as cadeias de aminoácidos podem ser apolares, polares não carregadas ou polares carregadas. O conhecimento da composição de aminoácidos de uma proteína é fundamental para selecionar parâmetros específicos para sua análise. O estudo da função de uma proteína se baseia em sua estrutura que é totalmente dependente do arranjo tridimensional. Esse arranjo se forma por processos de dobramento da cadeia peptídica, o que a torna capaz de se ligar a moléculas diversas e desempenhar vários papéis nos sistemas biológicos. Vários agentes podem romper a estrutura tridimensional das proteínas, entre eles: mudanças no pH ou concentração de sal, que alteram as interações eletrostáticas entre os aminoácidos; mudanças na temperatura, uma vez que temperaturas elevadas reduzem a força das pontes de hidrogênio; e presença de agentes redutores, que rompem as ligações dissulfeto entre resíduos de cisteína.

Três estratégias básicas podem ser utilizadas para a separação, purificação e análise de proteínas: a eletroforese, a ultracentrifugação e a cromatografia. As proteínas podem ser separadas umas das outras ou de outros tipos de moléculas, por meio de métodos de separação que se baseiam nas propriedades das proteínas, como: **solubilidade**, **tamanho molecular**, **carga iônica** e **especificidade de ligação** com outras moléculas biológicas.

Solubilidade

A solubilidade das proteínas depende de pH, concentração de sais e constante dielétrica do solvente. A variação da carga líquida de uma proteína tem implicações na sua solubilidade. No ponto isoeletrico - pI (pH em que a proteína apresenta o mesmo número de radicais ácidos desprotonados e básicos protonados), a solubilidade é menor do que em outros valores de pH, em que as moléculas têm todas a mesma carga e se repelem eletrostaticamente, estabilizando-se em solução.

As proteínas apresentam também variação de solubilidade em função da concentração de sais. A solubilidade da maioria das proteínas é diminuída em altas concentrações de sais. Esse efeito, denominado em inglês de *salting-out*, é muito útil, pois o excesso de sal retira a água de solvatação das proteínas que se precipitam (precipitação salina). A relação da solubilidade com a concentração de sal difere de uma proteína para outra. Portanto, pode-se usar o *salting-out* para fracionar proteínas. Por exemplo, o sulfato de amônio a 0,8 M precipita o fibrinogênio plasmático, enquanto que a albumina do soro é precipitada somente a 2,4 M do mesmo sal. O *salting-out* é também útil para concentrar soluções diluídas de proteínas. Por outro lado, muitas proteínas globulares, insolúveis em água, são solúveis em soluções salinas diluídas. Esse aumento da solubilidade é denominado *salting-in*.

A solubilidade das proteínas pode ainda ser alterada por adição de solventes orgânicos miscíveis com a água, como a acetona e o etanol. Nesse caso, a redução da constante dielétrica do meio leva à precipitação das proteínas.

Tamanho Molecular

As proteínas podem ser separadas, em função de sua massa molecular, por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. As proteínas da mistura são dissolvidas em uma solução de sulfato de sódio dodecila (SDS) – um detergente aniônico que rompe as ligações não covalentes nas proteínas naturais. Nesse procedimento, adiciona-se também mercaptoetanol ou ditioneitol para reduzir as pontes dissulfeto. Os ânions do SDS se ligam às cadeias principais dos aminoácidos, em proporção aproximada de 1:2, o que confere ao complexo SDS-proteína uma carga negativa proporcional à massa da proteína.

Os complexos SDS-proteínas desnaturadas são submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida, na forma de uma placa fina vertical. A esse sistema aplica-se uma carga elétrica e as proteínas migram para o polo positivo. As proteínas pequenas se movem rapidamente no gel, enquanto as grandes são mais retidas, próximas ao ponto de aplicação da mistura. A motilidade da maioria das cadeias polipeptídicas nessas condições é diretamente proporcional ao logaritmo de sua massa. Essa relação empírica, no entanto, não é seguida por algumas proteínas.

As proteínas também podem ser separadas de moléculas com menor tamanho por sistema de diálise utilizando uma membrana semipermeável. As moléculas de tamanho maior que o diâmetro dos poros da membrana de diálise são retidas enquanto que as moléculas menores e os íons atravessam os poros da membrana e são dializadas.

Outro método utilizado para a separação de proteínas com base no tamanho molecular é a cromatografia de filtração em gel. Nesse método, a mistura de proteínas é aplicada sobre uma coluna constituída de partículas porosas de um polímero insolúvel e altamente hidratado, como dextrana, agarose ou poliacrilamida. Sephadex, Sepharose e Biogel são preparações comerciais comuns de polímeros com aproximadamente 100 µm de diâmetro. Na cromatografia de filtração, as moléculas pequenas podem entrar nos poros do polímero, mas não as grandes. Assim, as moléculas pequenas se distribuem dentro e fora dos poros, enquanto as moléculas grandes se localizam fora dos poros. As moléculas grandes fluem mais rapidamente pela coluna cromatográfica e são eluídas primeiro porque há um volume menor acessível a elas. Deve-se notar que a ordem de eluição das moléculas, na cromatografia de filtração em gel, é contrário a ordem em eletroforese em gel, na qual uma rede contínua do polímero impede o movimento das moléculas grandes. Podem-se separar quantidades muito maiores de proteína por cromatografia de filtração em gel do que por eletroforese em gel de poliacrilamida.

Carga Iônica

As proteínas podem ser separadas em função da sua carga líquida pela cromatografia de troca iônica. Se uma proteína tiver uma carga resultante positiva em pH 7,0, se ligará a uma coluna de polímero poroso contendo grupos carboxílicos, ao passo que uma proteína com carga negativa não o fará. A proteína com carga positiva ligada à coluna de troca iônica pode ser deslocada (eluída) pelo aumento da concentração de cloreto de sódio ou de outro sal no tampão de eluição. Os íons sódio competem com os radicais com carga positiva da proteína pela ligação à coluna. Assim, proteínas que tem baixa densidade de carga positiva líquida tendem a ser eluídas primeiro, seguidas das que possuem maior densidade de cargas.

Especificidade de Ligação

A cromatografia de afinidade é um método bastante aplicável para purificação de proteínas. Esse método se fundamenta na afinidade de proteínas por grupos químicos específicos. A concanavalina A, por exemplo, é uma proteína vegetal que pode ser purificada passando-se o extrato vegetal bruto por uma coluna de polímero poroso contendo radicais de glicose ligados covalentemente. Como a concanavalina A apresenta grande afinidade por glicose e irá ligar-se a esta molécula permanecendo aderida à coluna, o que não ocorre com a maioria das outras proteínas que são eluídas. Para se eluir a concanavalina A tomada neste exemplo, adiciona-se uma solução concentrada de glicose que a deslocará para a solução. Em geral, a cromatografia de afinidade pode ser utilizada com eficiência para isolar uma proteína de interesse que reconheça um radical específico. Esse radical poderá ser ligado a uma coluna que será colocada em contato com a proteína de interesse. Em seguida, a coluna poderá ser lavada com uma solução concentrada do mesmo radical que promoverá a eluição da proteína.

Enzimas Proteolíticas

Há um crescente consenso de que todo compartimento celular é perfundido ou contém múltiplas proteases, embora o papel da maioria destas enzimas proteolíticas continue um mistério. No entanto, é surpreendente que a grande maioria das proteínas escape da ação das proteases, enquanto poucas sucumbem ao advento da proteólise. Esta maquinaria existente em basicamente todas as células vivas é composta por elementos para autodestruição como enzimas digestivas hidrolíticas, entre elas as nucleases, polissacarídeo-hidrolases, fosfatases e proteases (proteinases ou enzimas proteolíticas).

Nas células de mamíferos, as proteases estão empacotadas em lisossomas organelas presentes no citoplasma responsáveis por captar polipeptídeos ou outros polímeros e destruí-los em circunstâncias fisiológicas. As proteases também estão envolvidas em uma série de importantes processos fisiológicos, como acilação e desacilação, clivagem de pro-hormônios – insulina, glucagon, paratiroide e renovação regulada de macromoléculas na matriz extracelular em determinados períodos do desenvolvimento e da migração e divisão celular.

As enzimas proteolíticas têm ações divididas em duas categorias: i) **proteólise limitada**, em que a enzima cliva somente uma ou poucas ligações peptídicas na proteína-alvo levando a ativação ou maturação da proteína inativa; ii) **proteólise ilimitada** ou total, em que a enzima degrada proteínas até seus constituintes finais, os aminoácidos. As proteínas a serem degradadas são usualmente conjugadas com múltiplas moléculas de ubiquitina. Essa modificação marca a proteína para a sua hidrólise rápida pelas proteases na presença de ATP. Outra forma de proteólise total é a compartimentalização das proteínas nos lisossomas, onde estas sofrem degradação rápida.

Em plantas, as enzimas hidrolíticas estão estocadas nos espaços vacuolares e sua ação no citoplasma está sob controle de inúmeros inibidores específicos. Em micro-organismos, as enzimas hidrolíticas podem ser encontradas no espaço periplasmático em bactérias gram-negativas, e no meio de cultura de gram-positivas. Sua principal função nesses micro-organismos é digerir macromoléculas do meio, tornando-os fragmentos pequenos suficientes para serem capturados pela célula.

Invariavelmente, todas as proteínas são degradadas intra ou extracelularmente, e então, sob determinadas condições, podem ser completa e efetivamente degradadas até aminoácidos por enzimas proteolíticas. Entretanto, além do seu papel fisiológico, essas enzimas podem ocasionar problemas. Isso ocorre, por exemplo, durante o processo de obtenção de um extrato proteico bruto de células ou tecidos, no qual quase sempre é rompido o delicado equilíbrio do meio intracelular que evita a destruição das proteínas intracelulares. O rompimento de lisossomos por homogeneização mecânica ou utilização de um tampão de lise põe em risco a proteína alvo a ser investigada, que geralmente se encontra em pouca abundância na célula. Desta forma, a proteólise indesejada é um problema universal encontrado na análise de proteínas isoladas de todos tipos de organismo. Qualquer estudo de proteínas deve ser conduzido de forma a evitar a proteólise. Além disso,

os procedimentos de isolamento, purificação e análise devem garantir que as proteínas isoladas representem as formas fisiológicas e que não se originaram de proteólise durante as etapas de preparação da amostra. Assim, é importante prevenir e identificar a proteólise *in vitro* para garantir resultados confiáveis no estudo estrutural e funcional das proteínas isoladas. Adiante, neste capítulo, serão comentados os procedimentos de prevenção e minimização da proteólise durante a obtenção de uma proteína.

As proteases são classificadas de acordo com o tamanho molecular, carga ou especificidade de substrato. Quatro classes de acordo com o mecanismo de ação são reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica: (i) as serino-proteases; (ii) as aspartato protease; (iii) as cisteíno protease e (iv) as metaloproteases. Na tabela 18.1, são apresentadas seis famílias de proteases que tem grupos de aminoácidos funcionais característicos com configuração particular, formando o sítio ativo.

As proteases são hidrolases, isto é, clivam por hidrólise as ligações peptídicas entre os resíduos de aminoácidos de uma cadeia polipeptídica. Os mecanismos de ação das endopeptidases são melhores entendidos que o das exopeptidases, assim denominadas por fazer parte do meio intra ou extracelular, respectivamente.

As serino-proteases principais, quimotripsina, tripsina e elastase, são enzimas produzidas pelo pâncreas de mamíferos. As serino proteases diferem entre si pela especificidade do substrato. Por exemplo, a quimotripsina tem maior afinidade por grupos aromáticos dos aminoácidos da cadeia cujo carbono da carbonila faça parte da ligação peptídica a ser clivada. A tripsina tem maior afinidade por aminoácidos carregados positivamente como a lisina e a arginina. As serino proteases são responsáveis pela hidrólise da ligação peptídica de proteínas por meio do ataque nucleofílico do resíduo de serina (Ser195), presente no sítio ativo da enzima, sobre o carbono presente na carbonila de um resíduo de aminoácido de um substrato. A reatividade das serino proteases envolve também a presença de resíduos histidina no sítio ativo da enzima. Ambos os sítios – serina e histidina destas proteases – são passíveis de inibição como indicado na figura 18.1.

As cisteíno proteases dependem de um resíduo cisteína nucleofílico que é passível da ação de inibidores apropriados. Estas proteases possuem um mecanismo catalítico que envolve o grupo sulfidril da cisteína. A desprotonização da sulfidril da cisteína ocorre pela ação de um resíduo histidina adjacente e é seguido pelo ataque nucleofílico do enxofre da cisteína ao carbono da

Tabela 18.1- Famílias de enzimas proteolíticas.

Família (*)	Proteases	Aminoácidos do sítio ativo (**)
Serinoproteases I (mamífero)	Quimotripsina (EC 3.4.21.1) Tripsina (EC 3.4.21.4) Elastase (EC 3.4.21.11) Calacreína Pancreática	Asp102, Ser195, His 57
Serinoproteases II (bactéria)	Subtilisina (EC 3.4.21.14)	Asp32, Ser221, His64
Cisteínoproteases	Papaína Atinidina Catepsinas de fígado de rato	Cys25, His159, Asp158
Aspartatoproteases	Penicilopepsina Rhizopus chineses e Endokia parasítica Renina protease-ácida	Asp33, Asp213
Metaloproteases I (mamífero)	Carboxipeptidase Bovina A (EC 3.4.17.1)	Zn, Glu270, Try248
Metaloproteases II (bactéria)	Termolisina (EC 3.4.24.4)	Zn, Glu143, His231

Fonte: Neurath, H. The diversity of proteolytic enzymes. In: Proteolytic enzymes. A practical approach Beynon, R.J. & Bond, J.S. eds. IRL PRESS Oxford. Capítulo 1 p. 1-13. *Esta tabela inclui somente enzimas de sequências de aminoácidos conhecidos e estrutura tridimensional, exceto para catepsinas fígado de rato B e H, para os quais a estrutura tridimensional tem sido suposta através da analogia com papaína. **O número de resíduos correspondente a sequência de aminoácidos das enzimas listadas em negrito na coluna 2.

carbonila. O tióéster formado liga o novo carboxiteminal à cisteína tiol em um intermediário da reação.

A papaína é a principal cisteíno protease de plantas. A catepsina é uma grande família de proteases lisossômicas com grande variedade de substratos. As caspases são cisteíno proteases envolvidas na ativação de apoptose. As calpaínas são cisteínoproteases ativadas por cálcio, que clivam proteínas intracelulares envolvidas na motilidade e adesão. Elas regulam processos como migração celular e cicatrização.

As aspartato proteases são uma importante família de enzimas hidrolíticas associadas a várias condições patológicas, como a hipertensão (renina), úlcera gástrica (pepsina), distrofia muscular e doenças neoplásicas (catepsina D e E). Estudos de cristalografia revelaram que o sítio ativo consiste de dois grupamentos carboxila dos resíduos: Asp-32 e Asp-215 – firmemente ligados a uma molécula de água. Para exercerem sua ação, essas enzimas hidrolíticas empregam esse par de resíduos de aspartato para sensibilizar e hidrolisar a ligação peptídica.

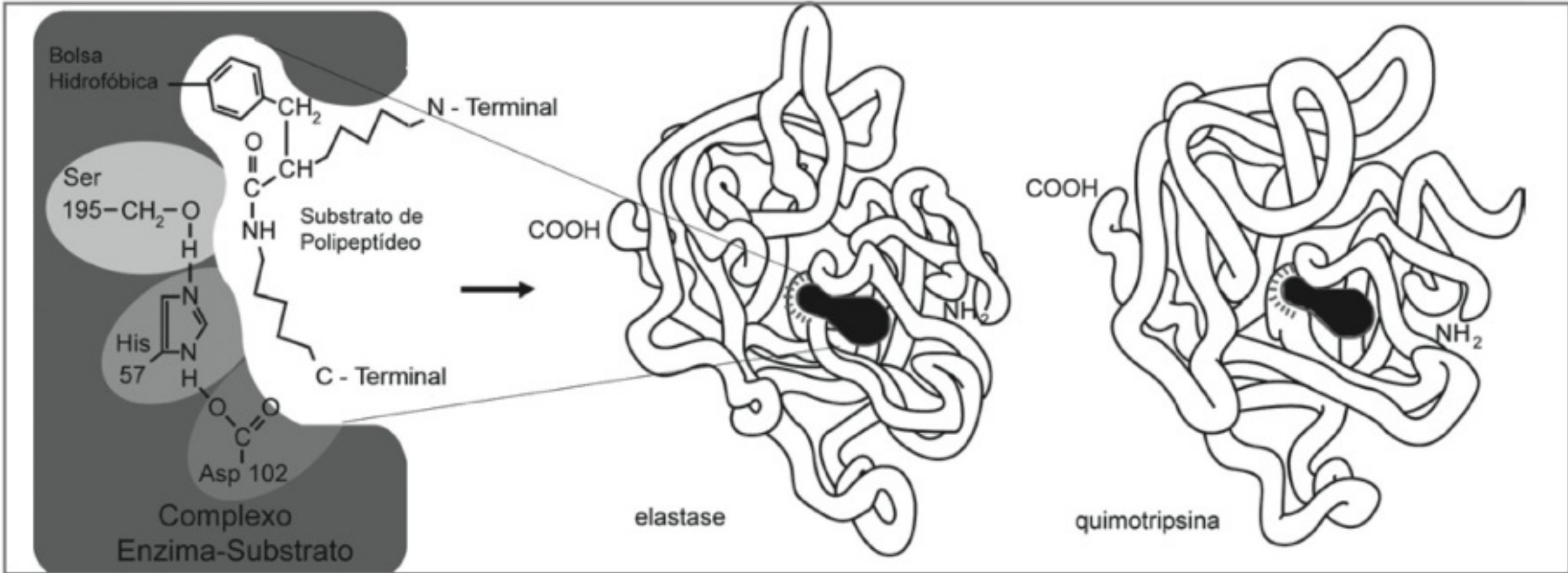


Figura 18.1 - Representação do complexo enzima-substrato das serino proteases, indicando os resíduos Ser195 e His57, essenciais para a ação proteolítica da enzima (A). Estrutura tridimensional de duas serino proteases – elastase e quimotripsina – ressaltando no centro (preenchido) o sítio catalítico (B). Adaptado de Alberts, et al., 2008.

As metaloproteases ou zincoproteases são dependentes da habilidade de retirar um elétron de um íon metálico, preferencialmente o zinco, podendo ser também o cobre e o níquel. Durante a catálise, o zinco promove o ataque nucleofílico ao carbono da carbonila através da molécula de oxigênio da água presente em seu sítio ativo. O sítio de ligação ao zinco no sítio ativo da enzima inclui dois resíduos de histidina cujo grupoamento imidazol está ligado ao zinco.

Nesse grupo de proteases, estão incluídas as carboxipeptidases, metaloproteases da matriz extracelular (MMP) que são secretadas pelas células e uma protease lisossomal. Algumas MMPs, como a colagenase, estão envolvidas na degradação da matriz extracelular durante o remodelamento do tecido. Outras possuem um papel relacionado à sinalização celular e na liberação de citocinas ou fatores de crescimento a partir da superfície celular pela clivagem de proteínas associadas à membrana. MMPs, como a estromelina 1, têm sido detectadas na periferia dos carcinomas invasivos, favorecendo a metástase tumoral por mecanismos de proteólise e angiogênese. Muitas MMPs também contribuem para a degradação das articulações e a artrite reumatoide.

As enzimas proteolíticas são indistintamente distribuídas em todos os tecidos biológicos e fluidos corporais. O repertório de proteases, componentes integrais das células, é enorme e, em parte, pouco explorado. Dentre as estudadas podemos citar a classe das proteases lisossomais, as serino proteases de granulócitos, proteases ligadas à membrana e proteases tecido-específicas presentes no sistema reprodutor, músculo, pele, cristalino, adrenal e pituitária. As proteases dependentes de ATP têm sido isoladas a partir do músculo esquelético, fígado, adrenal, reticulócitos e outros tecidos. Ambos os grupos de proteases tem um pH alcalino ótimo.

Em contraste a essas proteases oligoméricas, proteases de alto peso-molecular (peso molecular 350-750 kDa), as cisteíno proteases lisossomais do fígado e baço têm baixo peso molecular (20-40 kDa) e são mais ativas em pH ácido. Muitas delas são glicoproteínas. As mais proeminentes proteases ligadas ou associadas à membrana são as peptidases de sinal eucarióticas, e certas serina e metalo-peptidases associadas com a borda em escova do intestino e rim.

As proteínas celulares estão sujeitas à renovação, embora as taxas sejam consideravelmente diferentes. Dessa forma, as proteínas isoladas a partir das células são substratos potenciais para uma ou mais enzimas proteolíticas endógenas. Dentro da célula, contudo, a proteólise é altamente controlada. Isso é devido a uma

combinação de fatores, incluindo compartimentalização, presença de inibidores de proteinase endógenos e a influência de uma variedade de componentes celulares que podem atuar sobre a conformação da proteína. Quando um tecido é rompido durante o isolamento de uma proteína, esses controles são perdidos. Compartimentos subcelulares são desfeitos, complexos enzima-inibidores se formam ou se dissociam e as interações entre proteínas e outras moléculas são alteradas. Componentes do tampão de extração podem afetar a conformação das proteínas e assim, aumentar a vulnerabilidade da proteólise.

Suscetibilidade Proteolítica das Proteínas Naturais

A estabilidade das proteínas difere marcadamente tanto *in vivo* quanto *in vitro*. As proteínas com maior renovação na célula são mais vulneráveis à proteólise no extrato celular. As proteínas de menor tamanho são mais resistentes à proteólise. As estruturas levemente enroladas das proteínas globulares são mais resistentes à proteólise devido às poucas ligações peptídicas expostas que permitem o ataque de proteases. Contudo, estruturas planas adjacentes presentes na porção N ou C-terminal da proteína são alvos vulneráveis ao ataque de proteases. Proteínas multifuncionais, que possuem mais de um sítio catalítico ou de ligação dentro de uma única cadeia polipeptídica, são dificilmente atacadas por proteases. Entretanto, ainda se desconhece por que algumas proteínas com centenas de ligações peptídicas são refratárias a ação de várias endo e exopeptidases, enquanto outras proteínas têm alta suscetibilidade ao ataque de proteases.

Algumas moléculas podem afetar direta ou indiretamente a conformação das proteínas. Agentes estabilizantes, como glicerol e dimetilsulfóxido (DMSO), estabilizam a conformação das proteínas. Agentes redutores, como mercaptoetanol e ditioneitol, previnem a oxidação de grupos tióis dos resíduos de cisteína e, deste modo, mantêm a estrutura natural das proteínas, embora tenham também efeito desestabilizador por redução de pontes dissulfeto intramoleculares. A ligação a moléculas, tais como substratos e cofatores, tendem a manter a proteína em uma conformação mais resistente à ação de proteases, embora algumas moléculas efetoras podem ter efeito oposto.

Se, por um lado, as proteases promovem importantes modificações enzimáticas em proteínas *in vivo*, de outro, torna-se um problema a ser vencido quando o in-

teresse é analisar e manipular as proteínas *in vitro*. Assim, faz-se necessário o uso de inibidores de proteases.

Inibidores de Proteases

A lise das células para o isolamento de proteínas pode resultar também em liberação de proteases dos compartimentos subcelulares. Essas proteases precisam ser removidas rapidamente para garantir que a proteína de interesse permaneça intacta. Alguns inibidores de proteases precisam ser utilizados para retardar ou efetivamente inibir a proteólise.

Os inibidores de proteases podem ser divididos em duas classes: (1) inibidor de baixo peso molecular, sítio ativo-específico que modifica irreversivelmente um resíduo de aminoácido do sítio ativo, e (2) inibidores de proteases de ocorrência natural, muitos dos quais se comportam como pseudosubstratos.

Membros proeninentes do primeiro grupo são: diisopropil fosfofluoridrato (DIPF) e fluoreto de *p*-fenilmetilsulfonila (PMSF), reagindo com sítio ativo da serino protease; e clorometil acetona derivado de aminoácidos e peptídeos que reagem com a histidina da tríade catalítica. Aspartato proteases são inativas por composto do tipo diazoacetil, bem como por meio de pepstatina pentapeptídeo deacilada. As metaloproteases são geralmente inibidas por agentes quelantes de metal, como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Carboxilases A e B são especificamente inibidas por proteína específica isolada da batata e a termolisina por fosforamidona. A tabela 18.2 contém mais informações sobre os principais inibidores de proteases disponíveis bem como sua concentração de uso, solubilidade e estabilidade.

Outros reagentes usados para prevenir proteólise, em um número limitado de estudos, incluem a bacitracina, inibidor de síntese de parede bacteriana; (TAME), substrato da tripsina; N-carbobenzoxi-L-fenilalanina (Cbz-Phe); metilamina; e fumarato de β -amoniopropionitrila.

Procedimentos de Prevenção da Proteólise

Para o isolamento e análise de uma proteína, além da utilização de inibidores de proteases, alguns cuidados devem ser tomados e protocolos devem ser desenvolvidos a fim de prevenir a atividade de enzimas proteolíticas endógenas. Esses procedimentos devem reduzir ação de proteases na amostra e permitir a rápida remoção de enzimas proteolíticas residuais que nem sempre é possível. Na tabela 18.3, são indicados vários procedimentos para suprimir a atividade de proteases endógenas.

Prevenção da Proteólise por Desnaturação

Se a proteína de interesse não necessita estar na sua forma ativa, como no caso de proteínas totais analisadas por SDS-PAGE, recomenda-se o uso de condições desnaturantes durante e após a lise celular. A extração da proteína pode ocorrer na presença de ureia, SDS ou hidrocloreto de guanidina. É importante ressaltar que proteinases são frequentemente resistentes à desnaturação do que outras proteínas.

Condições desnaturantes leves podem acelerar a proteólise expondo sítios de proteínas alvos sem a inativação de proteinases. Inibidores de proteinases devem ser utilizados, em condições desnaturantes, principalmente se agentes redutores e SDS forem adicionados às amostras sem aquecimento a 100°C. O aquecimento das amostras, imediatamente após a adição do agente desnaturante, assegura a inativação da maioria das proteinases. Incubação a 100°C durante 2-3 minutos é suficiente para preparar as amostras para análise por eletroforese em sistema desnaturante. Para assegurar um rápido equilíbrio quando as amostras são aquecidas, os volumes das amostras deverão ser o menor possível. Temperatura inferior a 100°C pode não prevenir a proteólise. Algumas proteinases podem resistir a condições de desnaturação drásticas e sua atividade pode ser restaurada quando os agentes desnaturantes são removidos. Assim, os processos de desnaturação nem sempre são uma solução permanente para prevenir a proteólise.

Métodos Empregados para Identificação de Proteínas

Os métodos empregados para a detecção, identificação ou quantificação de proteínas têm as mais variadas aplicações. Na sequência, são indicadas as principais aplicações dos métodos de identificação de proteínas e os capítulos em que as informações mais detalhadas podem ser encontradas.

A detecção e identificação de proteínas em extratos totais ou frações e em etapas de purificação de proteínas está detalhada no Capítulo 5 - Separação e Identificação de Ácidos Nucleicos e Proteínas e no Capítulo 24 - Identificação das Proteínas por Eletroforese Bidimensional.

A quantificação de proteínas em extratos totais, frações e proteínas purificadas pode ser realizada por espectrofotometria, como detalhado Capítulo 19 - Espectrofotometria para Análise de Proteínas Totais e Capítulo 20 - Determinação Espectrofotométrica de Proteínas.

Tabela 18.2 - Inibidores de proteases usuais.

Inibidor	Peso Molecular	Proteases inibidas	Observações importantes
Pepstatina A	685,9	Inibidor de aspartato proteases ácidas e muitas proteases de micro-organismos	CE 1 μ M. Solução estoque 1 mM. Solúvel em metanol. Estável por meses a -20° C.
Ácido iodoacético (IAA)	186	Inibidor de cisteíno proteases (não é específico para resíduos cisteínas no sítio ativo, podendo inibir outras enzimas)	CE 10-50 μ M. Solução estoque 10-100 mM em água. Decompõe-se lentamente.
E64	357,4	Inibidor cisteíno proteases (inibidor irreversível que não modifica resíduos cisteína de outras enzimas)	CE 10 μ M. Solução estoque 1 mM em água, estável por meses a -20°C.
Cloroacetil-HO-Leu-Ala-Gli-NH ₂	30,8	Inibidor de cisteíno proteases	CE 1 mM. Solução estoque de 10 mM em água. Preparar na hora do uso.
Leupeptina	475,6	Inibidor da maioria das cisteíno proteases e também serino-proteases	CE 1-100 μ M. Solução estoque 10 mM em água ou tampão. Estável uma semana a 4° C ou um mês a -20°C.
TLCK	369,4	Inibidor irreversível de tripsina e outras serino e cisteíno proteases	CE 10-100 μ M. Solução estoque 10 mM em água (pH 3-6). Preparar na hora do uso.
TPCK	351,9	Inibidor irreversível de quimotripsina e outras serino e cisteíno proteases	Solubilidade limitada. Especificidade limitada com serino proteases (inibidor enzimas semelhantes a quimotripsina).
PMSF	174,2	Inibidor reversível de serino proteases (quimotripsina, trombina, tripsina, plasmina e papaína)	CE 0,1-1 mM. Solução estoque 20-100 mM em metanol, etanol, propanol ou DMSO. Estável por 9 meses a 4° C. É instável em meio aquoso, diluir no tampão imediatamente antes do uso.
DFP ou DipF	184,2	Inibidor irreversível de todas as serino proteases. Altamente tóxico pois inibe a acetilcolinesterase	CE 0,1 mM. Solução estoque de 200-500 mM em propanol. Estável vários meses a -70° C.
3,4 DCI	215	Inibidor de muitas serino proteases. Lentamente reversível. Não é ativo para beta-lactamases	CE 5-100 μ M. Solução estoque 100 mM em DMSO ou DMFA. Estável a -20° C.
Quimostatina	607,7	Inibidor reversível de serino e cisteíno proteases como quimotripsina, papaína e catépsinas A, B e C	CE 10-100 μ M. Solução estoque 10 mM em DMSO. Estável por meses a -20°C.
Antipapaína	604,7	Inibidor de papaína, tripsina, catépsinas A e B, e em menor extensão a plasmina	CE 1-100 μ M. Solução estoque 10 mM em água ou tampão. Estável uma semana a 4° C e um mês a -20° C.
Elastatinal	512,6	Inibidor da serino protease similar à elastase	CE 10-100 μ M. Solução estoque 10 mM em água. Estável uma semana a 4° C e um mês a -20° C. Estável uma semana a 4° C e meses a -20°.
Aprotinina	~6500	Inibidor de serina proteases: plasmina, quimotripsina, calicreína e tripsina	CE 1-2 μ M. Solúvel em água. Solução estoque 10 mM.
EDTA	372,24	Inibidor de metaloproteases. É quelante reversível. Pode desestabilizar algumas serino proteases e interferir em processos biológicos dependentes de metais	CE 1 mM. Solução estoque 0,5 M em água (pH 8,5). Estável por meses a 4° C.
Fosforamidona	543,6	Inibidor de metalo-endopeptidases de mamíferos e bactérias	CE 1 μ M. Solução estoque 1 mM em água. Estável por um mês a -20° C.
1,10-Fenantrolina	198,2	Inibidor de metaloproteases	CE 1-10 mM. Solução estoque 200 mM em metanol. Estável por meses a -20° C.

Fonte: North M.J. Prevention of unwanted proteolysis. In: Proteolytic enzymes a practical approach. Beynon, R.J. & Bond, J.S. eds. IRL PRESS Oxford. Capítulo 6 p. 112. 1989. CE: concentração efetiva; DMSO: dimetilsulfóxido; DCI: dicloisocumarim; DFP ou DipF: diisopropilfosfofluoridrato; EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético; PMSF: fluoreto de p-fenilmetilsulfonila; TLCK: Clorometilcetona de N- α -p-tosil-L-Lisina; TPCK: Cromometilcetona de tosil-L-fenilalanina; 3,4 DCL - 3,4 decloisocumarim; Dip F ou DFP - diisopropilfosfofluoridrato; PMSF - Fluoreto de p-fenilmetilsufonila; EDTA - Ácido Etilenodiaminatetracético.

Tabela 18.3- Procedimentos que auxiliam na inibição de proteases em preparados proteicos

Fator	Procedimento
pH e tampão	Usar um tampão com pH abaixo ou acima da atividade ótima de proteínases. Não há variações de pH em que todas as enzimas proteolíticas se tornam inativas, porém acima do pH neutro as atividades de enzimas não específicas e altamente ativas dos lisossomos ou vacúolos podem ser minimizadas. Se, como em leveduras, o pH celular é menor que 7,0 (neutro), uma alta concentração de tampão deverá ser usada. Um pH neutro favorece interações entre proteínases e algum inibidor endógeno poderá promover algum grau de proteção.
Baixa temperatura	A atividade das proteínases é minimizada quando se trabalha a baixa temperatura. Em geral os procedimentos de extração de proteínas e principalmente os que duram um longo período de tempo devem ser conduzidos em gelo e as amostras estocadas em gelo.
Tempo	Tempo curto de preparação diminui a probabilidade de proteólise. Procedimentos longos, como a diálise por mais que 12 h, devem ser realizados com a inclusão de inibidores de proteínases no tampão de diálise. Em alguns sistemas, como por exemplo, leveduras e alguns fungos filamentosos, a incubação de extração prolongada resulta em ativação de proteínases devido à degradação dos inibidores endógenos.
Agentes estabilizadores	Reagentes que estabilizam proteínas podem proteger contra proteólise. A inclusão de glicerol (15-35% v/v) ou dimetilsulfóxido (DMSO) (10% v/v) pode ser útil durante a preparação e armazenamento. Agentes redutores semelhantes ao ditioneitol (DTT) (0,1-1 mM) ou mercaptoetanol (1-10 mM) asseguram que os grupos tióis livres não sejam oxidados, porém podem ativar cisteína-proteínases. Os reagentes poderão afetar a atividade da proteína de interesse e agentes redutores poderão diminuir a eficácia de alguns inibidores de proteínase.
Proteína exógena	A adição de proteínas exógenas, como a albumina bovina do soro (1-5 g/L), pode proteger contra a proteólise, por oferecer um substrato alternativo para as proteínases endógenas. Etapas adicionais devem ser introduzidas na preparação para remover as proteínas exógenas.
Efetores	Efetores de baixo peso molecular tais como substratos, análogos de substratos e cofatores podem auxiliar a manter a proteína em uma conformação estável e prevenir o ataque proteolítico. Nem todos os substratos ou cofatores podem ser necessariamente efetivos. Nem todos os substratos ou cofatores poderão ser necessariamente efetivos. Cada substrato e cofator deverão ser testados como parte de um processo de triagem para encontrar o melhor agente protetor.
Omitir ativadores	Ativadores de proteínases potenciais tais como cátions divalentes, os quais podem ativar e/ou estabilizar proteases, devem ser excluídos dos tampões de extração.

Fonte: North M.J. Prevention of unwanted proteolysis. In: *Proteolytic enzymes a practical approach*. Beynon, R.J. & Bond, J.S. eds. IRL PRESS Oxford. Capítulo 6 p. 112. 1989.

A detecção, identificação e quantificação de proteínas, em extratos, frações e proteínas isoladas, pode ser realizada por métodos imunoquímicos, como descrito no Capítulo 21 - Imunoensaio Enzimático para Detecção de Proteínas, Capítulo 22 - Identificação de Proteínas por Imunoprecipitação, Capítulo 23 - Identificação de proteínas por Western Blotting e Capítulo 26 - Identificação de Proteínas por Imunoistoquímica.

Os métodos de detecção e quantificação de proteínas no seu estado natural estão detalhados no Capítulo 25 - Análise de Expressão de Proteínas Celulares usando Técnica de Citometria de Fluxo.

Os métodos de análise da atividade de proteínas com propriedades catalíticas estão descritos no Capítulo 35 - Análise da Atividade Enzimática.

Os métodos de identificação de sequências de aminoácidos e caracterização de proteínas são detalhados no Capítulo 27 - Identificação de Proteínas Extraídas de Géis de Eletroforese Bidimensional Utilizando a Espectrometria de Massas, no Capítulo 28 - HPLC para Isolamento e Identificação de Compostos e no Capítulo 29 - HPLC para Análise de Aminoácidos.

As modificações químicas de proteínas podem ser detectadas por métodos detalhados no Capítulo 30 - Detecção de proteínas Glicosiladas, Capítulo 31 - Identificação de Proteínas Fosforiladas, Capítulo 32 - Detecção de Proteínas S-Nitrosiladas e Capítulo 33 - Análise de Fosfopeptídeos e Fosfoaminoácidos em Cromatografia de Camada Delgada (TLC).

As interações entre proteínas e ácidos nucleicos podem ser detectadas por método detalhado no Capítulo 34 - Análise das Proteínas Ligadoras de DNA por Ensaio de Alteração de Mobilidade Eletroforética em Gel de Poliacrilamida (EMSA).

Referências

- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D. *Molecular Biology of the Cell*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 5th ed., 2008, Cap. 3.
- Neurath, H. The diversity of proteolytic enzymes. In: *Proteolytic enzymes. A practical approach* Beynon, R.J. & Bond, J.S. eds. IRL PRESS Oxford. Cap.1, 1989, p. 1-13.

North, M.J. Prevention of unwanted proteolysis. In: *Proteolytic enzymes a practical approach*. Beynon, R.J. & Bond, J.S. eds. IRL PRESS Oxford. Cap. 6, 1989, p. 112.

Schultz, R.M. e Liebman, M.N. Proteínas I: Composição e Estrutura. In: *Manual de Bioquímica com correlações*

clínicas. Ed. Thomas M Devlin, Editora Edgard Blucher Ltda, 1ª. ed., 2003, p 81-139.

Walker, J.M. *The protein protocols handbook*. Science, 2002, p. 1146.

19. Espectrofotometria para Análise de Proteínas Totais

*Dimas Augusto Morozin Zaia
Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia*

Introdução

Espectro Eletromagnético

Quando temos um feixe de luz constituído por um único comprimento de onda dizemos que ele é monocromático, e quando é constituído por dois ou mais comprimentos de onda, dizemos que é policromático ou heterocromático. Mesmo as melhores redes de difração isolam faixas de comprimentos de ondas, portanto, em espectrofotometria, sempre trabalhamos com luz policromática. No caso da espectrofotometria, a unidade mais comum de medida de comprimento de onda é o nanômetro (nm),

sendo que $1 \text{ nm} = 1,0 \times 10^{-9} \text{ m}$. Os espectrofotômetros (Fig. 19.1) modernos normalmente trabalham na faixa de 200 a 700 nm. Na faixa de 200 a 380 nm, estamos trabalhando no comprimento de onda na faixa de luz ultravioleta, e na faixa de 380 a 700 nm, na região da luz visível. A luz branca, na verdade é uma mistura complexa de todos os comprimentos de onda do visível. A tabela 19.1 mostra as faixas de comprimentos de onda correspondentes às diferentes cores e às diferentes cores complementares. As cores de um objeto são devido a comprimentos de onda transmitidos ou refletidos, os quais denominamos de cores complementares. Quando um feixe de luz branca in-

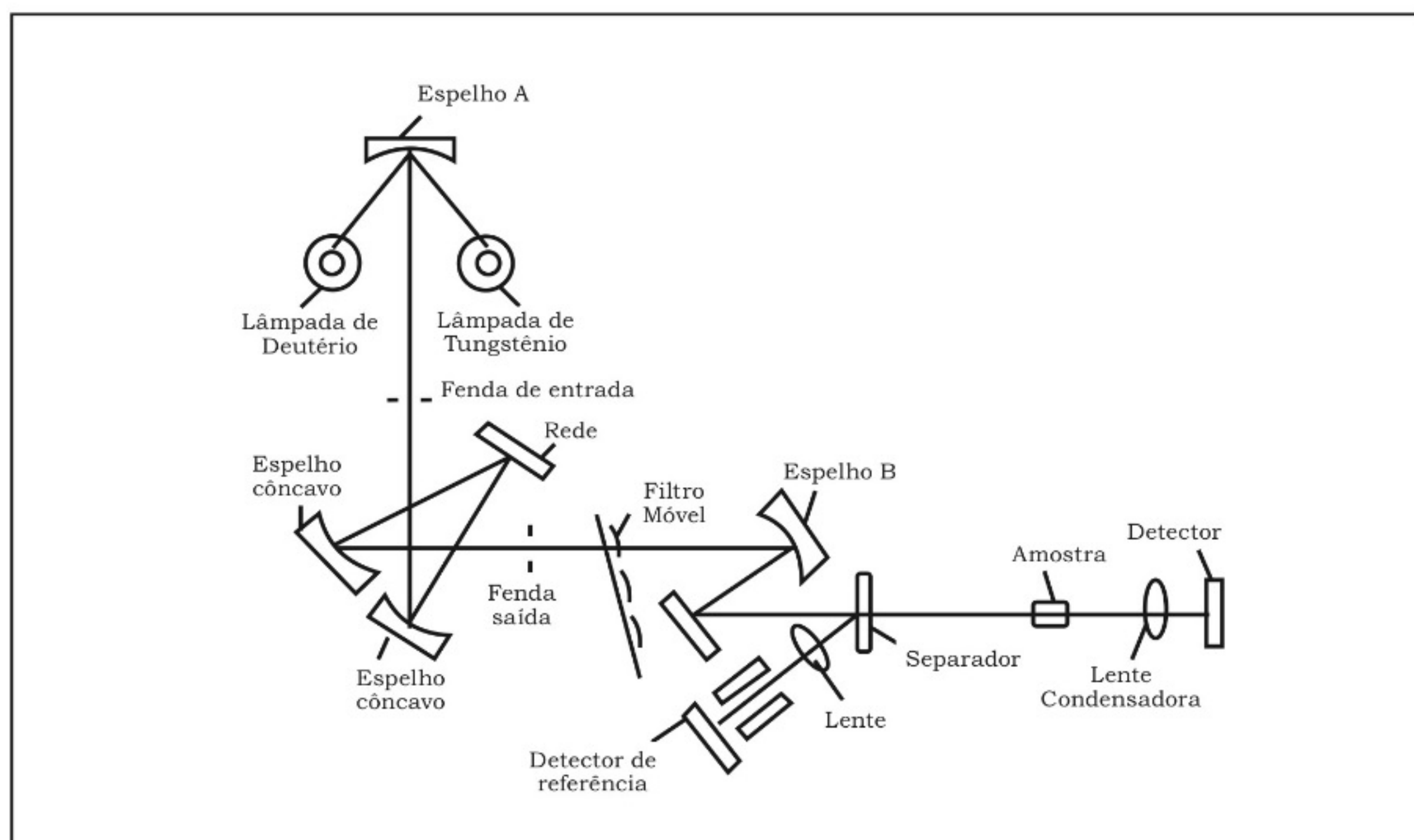


Figura 19.1 – Esquema da parte ótica de um espectrofotômetro.

cide sobre um objeto se este é branco significa que todos os comprimentos de onda são refletidos e se este é preto todos os comprimentos de onda são absorvidos (Jeffery et al., 1992; Ohlweiler, 1980).

Absorção da Radiação Eletromagnética

Quando um feixe de luz (radiação eletromagnética) atravessa uma amostra que pode ser gasosa, líquida ou sólida, uma parte da radiação pode ser absorvida e a energia da luz é transferida para a amostra. Os átomos ou moléculas da amostra passam de um estado fundamental para um estado que chamamos de excitado. No entanto, o tempo em que os átomos ou moléculas permanecem neste estado é muito pequeno, sendo da ordem de 10^{-8} segundos. Quando o átomo ou molécula volta ao estado fundamental, a energia liberada é, na maioria das vezes, dissipada na forma de calor. Porém, pode ocorrer que a forma excitada do átomo ou molécula sofra uma transformação química; neste caso, temos uma reação fotoquímica e em outros casos pode ocorrer que a radiação seja reemitida como fluorescência ou fosforescência. Entretanto, os átomos ou moléculas não absorvem radiação de qualquer comprimento de onda, mas sim apenas determinados comprimentos de onda, ou seja, a absorção é quantizada. Isto significa que a energia da radiação (equação 1) tem que ser igual à diferença de energia do átomo ou molécula no estado fundamental para o estado excitado (equação 2). Igualando a equação 1 à 2, obtemos a equação 3 (Jeffery et al., 1992; Ohlweiler, 1980).

Equação 1

$$E = h \times \nu$$

Onde temos:

h = constante de Planck ($6,62608 \times 10^{-34}$ Joules \times segundos)

ν = frequência da radiação (Hertz) ou $\nu = c/\lambda$ [c = velocidade da luz ($2,99792458 \times 10^8$ m/s) e λ = comprimento de onda (m)]

Equação 2

$$\Delta E = E_{\text{estado excitado}} - E_{\text{estado fundamental}}$$

Igualando a equação 1 com a equação 2 obtemos:

Equação 3

$$\Delta E = h \times \nu$$

Em nosso caso (determinação espectrofotométrica de proteínas), trabalhamos com a amostra em solução aquosa e na faixa do espectro que utilizamos (200 a 700 nm), estamos medindo transições eletrônicas, ou seja, a radiação absorvida por uma molécula provoca o salto de um elétron de um estado fundamental para um excitado. A energia total de uma molécula é dada pela soma da energia rotacional mais a energia vibracional mais a energia eletrônica, como mostra a equação 4 (Jeffery et al., 1992; Ohlweiler, 1980).

Tabela 19.1 – Faixas dos comprimentos de onda das diferentes cores (Ohlweiler, 1980).

Faixa de comprimentos de onda (nm)	Cor	Cor complementar
200-380	Ultravioleta	
380-435	Violeta	Verde-amarelada
435-480	Azul	Amarela
480-490	Azul-esverdeado	Alaranjada
490-500	Verde-azulado	Vermelha
500-560	Verde	Púrpura
560-580	Verde-amarelado	Violeta
580-595	Amarelo	Azul
595-650	Alaranjado	Azul-esverdeada
650-780	Vermelho	Vermelho-azulada
> 780	Infravermelho	

Equação 4

$$E_{\text{total}} = E_{\text{rotacional}} + E_{\text{vibracional}} + E_{\text{eletrônica}}$$

Todas estas formas de energia são quantizadas, sendo a energia eletrônica a maior de todas. Na figura 19.2 observa-se a representação esquemática dos níveis energéticos eletrônicos, vibracionais e rotacionais de uma molécula e fornece a ideia da ordem de grandeza de cada um, sendo que os níveis eletrônicos E_0 e E_1 correspondem ao nível fundamental e excitado, respectivamente. Dentro de cada nível eletrônico, podemos ter, por exemplo, quatro níveis vibracionais (v_0, v_1, v_2 e v_3), sendo que v_0 é o nível vibracional mais baixo. Finalmente, dentro de cada nível vibracional, podemos ter, por exemplo, quatro níveis rotacionais (r_0, r_1, r_2 e r_3), sendo que r_0 é o nível rotacional mais baixo. Na temperatura ambiente, as moléculas estão no nível eletrônico fundamental (E_0) e no vibracional fundamental (v_0). Por causa dos níveis vibracionais e rotacionais de uma molécula, o número de possíveis transições é grande. Portanto, quando registramos um espectro de moléculas em solução no ultravioleta ou no visível, observamos uma banda larga, que é devido a transições eletrônicas

acompanhadas de transições vibracionais e rotacionais, e os aparelhos não conseguem resolver em raias simples (Jeffery et al., 1992; Ohlweiler, 1980).

Lei de Beer-Lambert

A lei de Beer-Lambert é, na realidade, uma combinação da lei de Beer e da de Lambert. Beer descobriu que a intensidade de um feixe de luz monocromático que atravessava uma amostra diminuía exponencialmente com a concentração da substância absorvente. Lambert descobriu que esta diminuição era ocasionada pelo tamanho do caminho óptico, ou seja, a espessura da cubeta (Jeffery et al., 1992; Ohlweiler, 1980). Da combinação destas duas leis, podemos tirar a seguinte equação:

Equação 5

$$A = a \times b \times c$$

Onde temos:

A = absorbância ou absorvância (número adimensional)

a = absortividade molar ($1.000 \text{ cm}^2/\text{moles}$)

b = tamanho do caminho óptico da cubeta (cm)

c = concentração da amostra (moles/L)

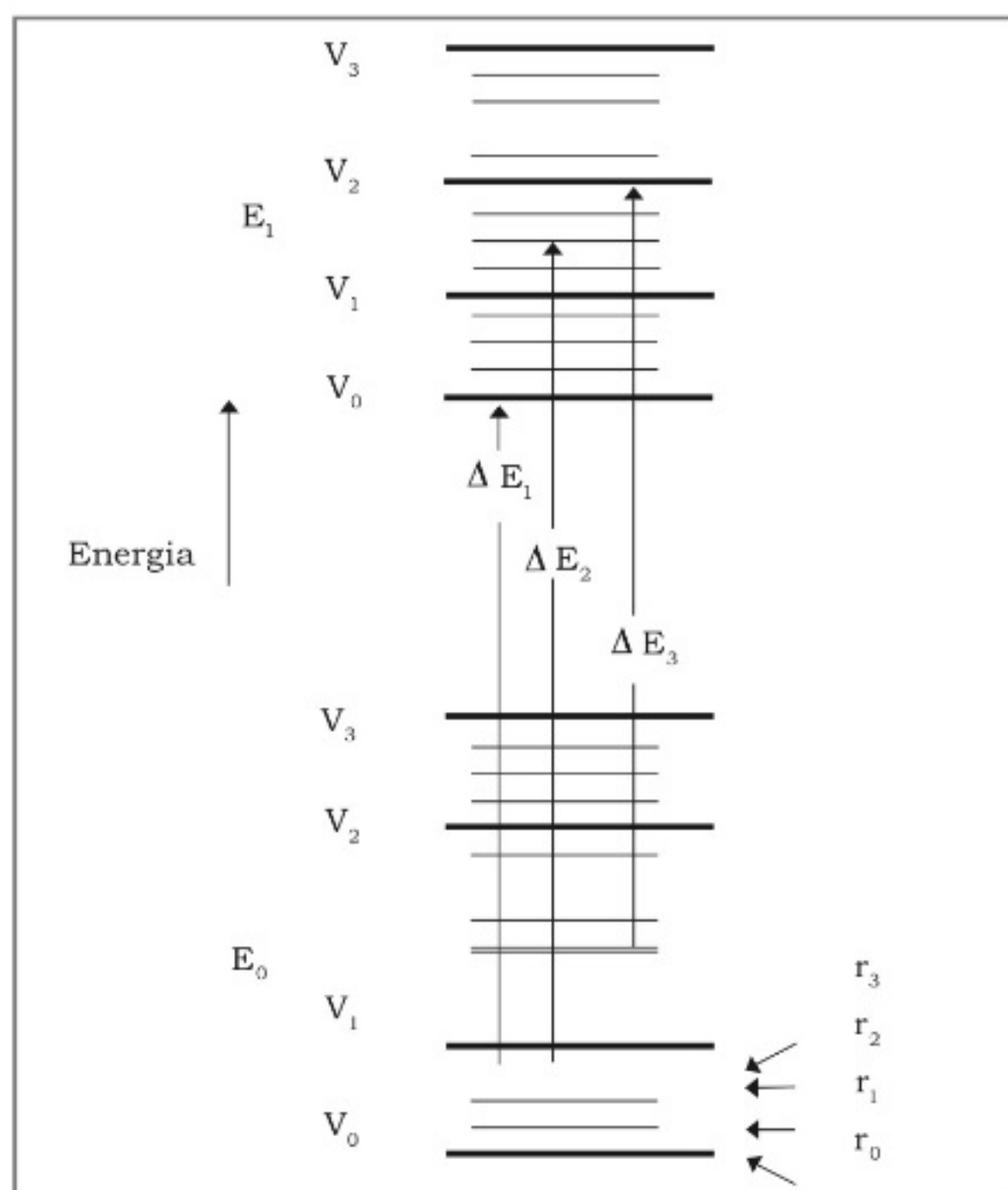


Figura 19.2. Representação esquemática dos níveis energéticos eletrônicos (E), vibracionais (v) e rotacionais (r) de uma molécula e a ordem de grandeza.

No caso da determinação de proteínas totais, não utilizamos a absortividade molar, mas sim o que chamamos de absortividade específica, que é medida em termos da massa de proteínas. A razão disto é que as proteínas utilizadas como padrão são na verdade um mistura de várias proteínas de diversos pesos moleculares, como, por exemplo, a albumina sérica bovina da fração V. Neste caso, escrevemos a equação 5 da seguinte forma:

Equação 6

$$A = \varepsilon \times b \times c$$

Onde temos:

A = absorbância (número adimensional)

ε = absortividade específica ($1.000 \text{ cm}^2/\text{g}$)

b = tamanho do caminho óptico da cubeta (cm)

c = concentração da amostra (g/L)

A absortividade específica pode ter outras unidades, dependendo de como a concentração de proteínas é expressa: se a concentração for em $\mu\text{g/mL}$, a absortividade

específica será em $\text{cm}^2/\mu\text{g}$; se a concentração for em mg/mL a absorvidade específica será dada em cm^2/mg , e assim por diante. Nos dois casos anteriores assumimos que $1 \text{ mL} = 1 \text{ cm}^3$.

Em alguns fotocolorímetros antigos, é mais comum a determinação da transmitância que é dada pela equação 7.

Equação 7

$$T = (P/P^0) \times 100\%$$

T= transmitância da amostra em porcentagem

P^0 = potência do feixe de luz monocromática que incide na amostra ou potência do feixe de luz monocromática específica após zerar o aparelho com o branco

P= potência do feixe de luz monocromática depois de atravessar a amostra

Para transformarmos a transmitância em absorbância, devemos utilizar a equação 8.

Equação 8

$$A = -\log (T/100)$$

Desvios da Lei de Beer-Lambert

Ao fazermos um gráfico de absorbância (A) *versus* concentração (c) de proteína-padrão, se a lei de Beer-Lambert for seguida na faixa de concentração que estamos trabalhando, obtemos uma reta. No entanto, podem ocorrer desvios devido a diversos fatores, tais como: limitações reais da lei de Beer-Lambert (reais), desvios químicos (aparentes) e desvios instrumentais (aparentes). Os desvios reais são aqueles devido a limitações na lei de Beer-Lambert e os desvios aparentes são aqueles que não dependem desta lei (Jeffery et al., 1992; Ohlweiler, 1980).

Limitações Reais da Lei de Beer-Lambert

Estes desvios ocorrem devido à interação entre os centros absorventes, pois na dedução da equação 1 supôs-se que as moléculas não interagem entre si e também por causa da variação do índice de refração do meio com a concentração da substância absorvente (Jeffery et al., 1992; Ohlweiler, 1980). No entanto, na maioria das vezes, quando trabalhamos com métodos analíticos para

a determinação de proteínas totais, estamos utilizando suas soluções diluídas, o que elimina os dois problemas citados.

Desvios Químicos

Estes desvios não são devido a um problema com a lei de Beer-Lambert, mas sim dependem do sistema químico em estudo. Podem ocorrer se a espécie absorvente associar-se, dissociar-se ou reagir com o solvente (Jeffery et al., 1992; Ohlweiler, 1980). Este tipo de desvio não é incomum em métodos analíticos de determinação de proteínas totais.

Desvios Instrumentais

Estes desvios, como o próprio nome diz, são devido a problemas com o instrumento de medida da absorbância e podem ser do seguinte tipo: largura da faixa espectral isolada pelo instrumento, radiações estranhas que refletidas dentro do instrumento alcançam o detector, variações da sensibilidade do detector e flutuações da fonte (Jeffery et al., 1992; Ohlweiler, 1980). Dos três problemas citados, o primeiro era o mais grave, no entanto, com os aparelhos modernos, a faixa espectral isolada é suficientemente pequena para que este problema não seja muito sério.

Características das Reações Usadas na Espectrofotometria

Para a determinação espectrofotométrica de proteínas totais, assim como de qualquer outra substância, normalmente temos que converter a substância que vai ser determinada por meio de uma reação em espécie absorvente apropriada. Portanto, a reação e a substância absorvente devem possuir determinadas características, sendo as mais importantes a sensibilidade e a seletividade da reação, a estabilidade e a reprodutibilidade da substância absorvente e o comportamento do sistema diante da lei de Beer-Lambert.

Sensibilidade

No caso de determinação de proteínas totais, a sensibilidade em alguns casos é o requisito mais importante, pois em algumas situações não dispomos de uma grande quantidade de amostra ou a concentração de proteína é baixa. Quanto maior for a sensibilidade de um método, significa que determinamos menor quantidade de massa da substância. Sensibilidade é definida como a menor massa de substância capaz de ser detectada em

uma coluna de secção transversal unitária; expressamos a sensibilidade em termos de $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. A faixa de concentração da proteína usada em cada curva-padrão para cada método é descrita no Capítulo 20.

Quanto menor a concentração de proteína visada, maior a sensibilidade.

Seletividade

Quanto mais seletiva a reação utilizada para a determinação de proteínas, menos problemas de interferentes teremos. No entanto, não existem reações cujos reagentes sejam específicos para uma única substância. Por isso, em cada método discutiremos o princípio envolvido, o que nos ajudará a determinar os possíveis interferentes.

Reprodutibilidade e Estabilidade

Alguns métodos para a determinação de proteínas totais apresentam problemas de reprodutibilidade, que

podem ser devidos a diversos fatores, porém cada caso será oportunamente discutido. A estabilidade de uma substância absorvente é um dado importante para o analista, por isso na metodologia de cada método daremos o tempo máximo em que a leitura deve ser realizada.

Comportamento do Sistema diante da Lei de Beer-Lambert

A lei de Beer-Lambert para cada método de determinação de proteínas totais é obedecida dentro de uma faixa de concentração, por isso na metodologia descreveremos a melhor faixa para cada caso.

Referências

- Jeffery, G.H.; Bassett, J.; Mendham, J.; Denney, R.C. Vogel, A. I. *Análise Química Quantitativa*. 5ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1992, pp. 521-545.
- Ohlweiler, O.A. *Química Analítica Quantitativa*. Vol. 3, 2ª ed., Livros Técnicos e Científicos Editora, Rio de Janeiro, 1980, pp. 665-746.

20. Determinação Espectrofotométrica de Proteínas Totais

Dimas Augusto Morozin Zaia
Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia

Introdução

Podemos dizer que a grande maioria das reações químicas que ocorrem dentro de qualquer ser vivo existente em nosso planeta de alguma forma envolve proteínas, peptídeos ou seus blocos construtores, os aminoácidos. As proteínas estão em todas as células, assim como em todas suas partes. Podemos citar alguns dos papéis desempenhados por estas substâncias, sendo estes: catálise de reações químicas (enzimas), proteínas nutrientes e de armazenamento, proteínas contráteis, proteínas estruturais, proteínas de defesa, hormônios, neurotransmissores, transportadores através de membranas celulares, dentre muitas outras (Lehninger et al., 2000). Portanto, a determinação de proteínas é de grande importância em diversas áreas de pesquisa e tecnologia. Para citarmos algumas, em análises clínicas a concentração de proteínas ajuda no diagnóstico de certas doenças (problemas renais e *diabetes mellitus*, que provocam proteinúria ou albuminúria, meningite bacteriana, problemas hepáticos etc.), nutrição humana e animal, ciência e tecnologia de alimentos, purificação de proteínas, culturas de tecidos e de microrganismos, em estudos neurofisiológicos (técnica de *micropunch* para a determinação de neuropeptídeos no cérebro, estudos de ingestão alimentar etc.), em ecologia, isto para citar somente algumas poucas áreas.

Existem muitas metodologias para a determinação de proteínas:

- Métodos cromatográficos, dentre estes destaca-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que possui uma série de vantagens, porém é mais utilizada nos processos envolvendo a separação e purificação de proteínas (Collins et al., 1995).
- O método de eletroforese, que também tem sido muito mais utilizada na separação e purificação de proteínas do que na sua determinação quantitativa (Tavares, 1996).

- O método utilizando o comprimento de onda no infravermelho próximo (700 a 1.100 nm) tem-se tornado uma metodologia analítica poderosa nos últimos anos e possui a grande vantagem de não exigir um preparo muito grande das amostras, no entanto também possui a desvantagem de fornecer espectros complexos, o que dificulta a análise dos dados (McClure, 1994).
- A espectroscopia de massa utilizando a técnica de volatilização por *eletrospray* tem-se tornado um equipamento indispensável na área de síntese de peptídeos e purificação de proteínas, pois através do peso molecular ajuda na sua identificação, no entanto não é utilizada para a determinação quantitativa de proteínas (Fenn et al. 1989).
- O mesmo ocorre com a técnica de ressonância magnética nuclear (RMN), que, apesar de em alguns casos poder ser utilizada para a determinação quantitativa de proteínas, é mais utilizada para estudos de sua conformação (Chmelka e Pines, 1989).
- A polarografia, uma técnica eletroanalítica que também foi utilizada para a determinação de proteínas, no entanto, os métodos polarográficos exigem pessoal qualificado, o que dificulta a utilização desta metodologia em análise de rotina (Heyrovsky e Kuta, 1966).
- O método de Kjeldahl, baseado na digestão ácida das proteínas com a liberação de amônio que é depois destilada na forma de amônia e determinada volumetricamente, apesar dos muitos inconvenientes (ser demorado, não determinar somente o nitrogênio proteico), é muito utilizado nas áreas de ciências e tecnologia de alimentos (Cunniff, 1995).

Como destacado por Zaia et al. (1998), os métodos usando a espectrofotometria no ultravioleta e visível (UV-Vis) são mais utilizados na determinação de pro-

teínas totais em meios biológicos, pois são diversas as vantagens que eles oferecem: os equipamentos são baratos, os princípios envolvidos nos métodos e nos equipamentos são simples, existe a possibilidade de automação de muitos métodos e finalmente não é exigido dos operadores grande conhecimento teórico ou técnico.

Preparo das Amostras

Plasma ou Soro Sanguíneo

Considerações gerais: o soro não contém as proteínas de coagulação (fibrinogênio), por isto o soro sanguíneo tem por volta de 4,0% a menos de proteínas do que o plasma. A concentração de proteínas no plasma ou soro sanguíneo em humanos pode variar devido a diversos fatores, tais como idade, sexo, estado de saúde do paciente etc. Devido a todos os fatores citados, a concentração de proteínas pode variar de 60 a 80 g/L. No caso do plasma ou soro sanguíneo de animais, também ocorre uma variação da concentração de proteínas de espécie para espécie. No entanto, nas espécies mais utilizadas em laboratório temos as seguintes concentrações: rato 63 g/L; coelho 72 g/L (Waynforth, 1980).

Obtenção do Plasma Sanguíneo

Após a retirada do sangue, este deve ser colocado dentro de um tubo contendo heparina (0,2 mg/mL concentração final) e imediatamente centrifugado a 2.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante (plasma sanguíneo) deve ser retirado com cuidado com uma pipeta de Pasteur e colocado em tubos de 1,5 mL ou 2,0 mL e armazenados em *freezer* a -18°C . Apesar de a heparina ser o anticoagulante mais utilizado, outros podem ser usados, tais como EDTA (1-2 mg/mL concentração final), fluoreto de sódio (6-10 mg/mL concentração final), citrato de sódio (34 ou 38 mg/mL concentração final) e oxalato de potássio (1-2 mg/mL concentração final). Entretanto, alguns cuidados devem ser tomados quando da utilização de alguns anticoagulantes que podem inviabilizar algumas determinações analíticas no plasma sanguíneo.

Obtenção do Soro Sanguíneo

Após a retirada do sangue, este deve permanecer em repouso e quando ocorrer a separação das fases (coagulação) o sobrenadante deve ser retirado com cuidado com pipeta de Pasteur e colocado em tubo com capacidade de 1,5 mL ou 2,0 mL e armazenado em *freezer* a -18°C .

Tecido Animal

Considerações gerais: a determinação de proteínas totais em tecido animal é muito importante, pois sua quantidade nos tecidos fornece uma maneira de expressar alguns tipos de resultados de forma reprodutível. Pode ser utilizada para expressar a quantidade de neuropeptídeos em tecido cerebral, atividade máxima de enzimas, velocidade de utilização e produção de substratos por culturas ou incubação de célula, assim como em muitas outras determinações. Descreveremos como obter homogeneizados de tecidos a partir da retirada de órgãos ou partes do animal (tecido adiposo, músculo etc.), e também a técnica de *micropunch* que é utilizada para a determinação de neuropeptídeos em tecido cerebral.

Obtenção do Homogeneizado de Tecido

Retirar do animal o órgão ou parte dele ou o tecido que se deseja homogeneizar. Adicionar à amostra solução salina fria ($4,0^{\circ}\text{C}$), na proporção de 1:10 (1,00 g de massa de tecido/10 mL de solução salina); utilizando um homogeneizador de alta velocidade, triturar a amostra por aproximadamente 2 minutos e centrifugar por 20 minutos a 3.000 rpm (para algumas situações deve ser utilizada uma centrífuga refrigerada). O sobrenadante deve ser retirado com cuidado com pipeta de Pasteur e colocado em tubos com capacidade de 1,5 mL ou 2,0 mL e armazenados em *freezer* a -18°C (em algumas situações, o sobrenadante deve ser armazenado em *freezer* a -80°C).

Obtenção de Tecido pelo Método de Micropunch

Segundo a técnica de Palkovits (1973), cérebros retirados e imediatamente resfriados em nitrogênio líquido devem ser cortados em criostato (-10°C), obtendo-se fatias de tecido cerebral de 200 a 300 μm . Utilizando-se estereomicroscópio com sistema para resfriamento de lâminas de histologia a -6°C , as estruturas, os núcleos ou áreas de interesse devem ser dissecados (*micropunch*) utilizando agulhas com diâmetro interno entre 300 e 1.000 μm , dependendo do tamanho da área. Os materiais dissecados devem ser colocados em tubos com capacidade de 1,5 mL ou 2,0 mL e mantidos em gelo seco. Para a extração das proteínas e neuropeptídeos do tecido nervoso, fazer digestão do material por fervura durante 25 minutos com 200 μL de ácido acético 0,5 a 2,0 mols/L. O tecido digerido deve então ser separado em quatro alíquotas e três delas armazenadas em *freezer* até o momento da determinação dos neuropeptídeos. Para a determina-

ção da quantidade de proteínas totais do material, uma das alíquotas deve ser deixada à temperatura ambiente para a total evaporação do ácido acético (48 horas), em seguida uma nova digestão deve ser feita. Para tal, acrescentar 50 μL de NaOH 1 mol/L, misturar por agitação e deixar descansar à temperatura ambiente por 24 horas; após, agitar novamente e deixar descansar por mais 24 horas e em seguida proceder à dosagem de proteínas totais. Como a quantidade de proteínas deste tecido dissecado é muito pequena, o método mais adequado é o de Bradford.

Amostras de Leite

Considerações gerais: devido a um aumento do consumo de queijo ocorrido nos últimos anos, a determinação do conteúdo de nitrogênio proteico em amostras de leite tem sido um importante dado para a indústria, no momento de pagar ao produtor o preço cobrado pelo leite. Devemos também salientar que a determinação de proteínas totais em amostras de leite é importante em diversas áreas tais como nutrição humana (qualidade do leite materno ou leite de outros animais), ciência e tecnologia de alimentos, estudos de fisiologia básica etc. Estudando os diferentes métodos para a determinação de proteínas no leite, Kamizake et al. (2003) recomendam a utilização do método de Bradford.

Obtenção das Amostras

Descrevemos uma aplicação para a determinação de proteínas totais em amostras de leite em pó utilizando o método de Bradford (Kamizake et al., 2003); esta metodologia pode ser usada para qualquer outro tipo de leite no estado líquido. No caso da caseína uma proteína desnaturada e que não é completamente solúvel em água, recomendamos sempre a dissolução em hidróxido de sódio 0,10 mol/L.

Métodos Espectrofotométricos mais Utilizados para a Determinação de Proteínas Totais em Meios Biológicos

Como destacado por Zaia et al. (1998), existem muitas metodologias espectrofotométricas para a determinação de proteínas totais em meios biológicos, no entanto somente poucas se popularizaram; muitos estudos foram realizados com elas, principalmente quando nos referimos a interferentes. Portanto, neste capítulo proporemos algumas aplicações para as metodologias mais utilizadas.

Método de Biureto

Princípio

A reação de biureto é conhecida desde 1915, quando Autenrieth a descreveu. A metodologia utilizada atualmente para a determinação de proteínas totais foi proposta em 1949 por Gornall et al. (1949). O método é baseado na reação do reativo de biureto, que é constituído de uma solução de cobre (II) em meio alcalino estabilizado por tartarato de sódio para evitar a formação de hidróxido de cobre e de iodeto de potássio como um antioxidante. Esse reagente, na presença de proteínas, forma um complexo quadrado planar com a ligação peptídica; este complexo absorve em 340 e 540 nm, sendo que a banda de 540 nm é devido a uma transição d-d, e a banda de 340 nm a um complexo de transferência de carga (Huheey et al., 1993). Apesar de a banda 340 nm apresentar uma absorvidade específica cerca de três vezes maior que a absorvidade específica de 540 nm (Kamizake et al., 2003), não recomendamos a banda de 340 nm, pois nesta região do ultravioleta diversas outras substâncias podem absorver e interferir na análise de proteínas totais.

Vantagens e Desvantagens

O método de biureto possui diversas vantagens: utiliza reagentes comuns e de baixo custo, a análise é rápida e fácil, pode ser automatizado, não está sujeito a muitos interferentes, o produto de reação é estável por um longo período de tempo, a absorvidade específica não é muito dependente da composição de aminoácidos das proteínas. A grande desvantagem é não ser muito sensível, tornando, em casos de baixa concentração proteica ou pequena quantidade de amostra, impossível sua utilização.

Interferentes

Podemos dizer que qualquer substância que possa vir a reagir com os íons Cu (II) pode ser um interferente em potencial. Algumas substâncias que podem ser adicionadas em meios biológicos devem ser citadas: o sulfato de amônio em meio alcalino reage com os íons, portanto não devemos usá-lo como precipitante de proteínas; o tampão Tris-HCl e glicose também não deve ser usado, pois este tampão reage com íons cobre; dextrano-40 e 70, causam aumento da turbidez visto que em meio alcalino formam um complexo insolúvel com os íons Cu (II) e peptídeos, e os aminoácidos (His, Ser, Thr) também reagem com os íons Cu (II). Outras substâncias que, dependendo da sua concentração, também podem ser interferentes são:

bilirrubina, lipídios, hemoglobina, melanina, amido e lactose (ver lista compilada por Zaia et al., 1998).

Aplicações da Metodologia

O método de biureto tem sido utilizado para a determinação de proteínas totais em diversos meios: soro ou plasma sanguíneo, urina, alimentos, líquido cérebro espinhal (líquor), saliva e tecido animal (ver lista compilada por Zaia et al., 1998). Das aplicações citadas, a maioria foi em fluidos biológicos, no entanto permanece o fato de que a baixa sensibilidade do método de biureto às vezes dificulta sua utilização. O método de biureto é recomendado pela Associação Americana de Análises Clínicas para a determinação de proteínas totais em plasma e soro sanguíneo. O método do biureto pode também ser utilizado para a determinação de proteínas totais em tecidos, desde que os lipídios dos tecidos não aumentem a turbidez da solução, fazendo com que tenhamos resultados falso-positivos. Zaia et al. (2000) recomendaram o método de biureto para a determinação de proteínas totais dos tecidos de adrenal, baço e intestino delgado, nos quais este problema não ocorreu. Beyer (1983) sugere uma forma de eliminar os lipídios dos tecidos. Devido ao fato de o Cu (II) do reativo de biureto reagir com a ligação peptídica, muitas vezes esta reação é utilizada para identificar se em extratos ou amostras, que estão sendo purificados, existem proteínas ou peptídeos. Porém, mesmo que o teste negativo não significa que não existam peptídeos ou proteínas na amostra, o problema é que a reação de biureto não é muito sensível e por isso este resultado deve ser visto com cautela.

Faixa de Linearidade e Estabilidade

Temos trabalhado na faixa de concentração de 1 a 7 gL⁻¹ com albumina sérica bovina (fração V), podendo, esta faixa, ser estendida que a lei de Beer-Lambert ainda é seguida. Após a adição do reativo de biureto (ver metodologia), recomendamos uma espera de 20-40 minutos (dependendo da temperatura ambiente) para a realização das leituras; no entanto, se aquecemos as amostras por 10 minutos a 37°C podemos esperar apenas 10 minutos. O produto de reação entre reativo de biureto e proteínas é estável por diversas horas e, no entanto, recomendamos que a absorbância seja lida em um tempo máximo de 2 horas.

Reagentes

- Albumina sérica bovina-fração V (BSA-fração V).
- Hidróxido de sódio-NaOH (P.A.).

- Sulfato de cobre penta-hidratado-CuSO₄.5H₂O (P.A.).
- Tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado-KOOC-(CHOH)₂-COONa.4H₂O (P.A.).
- Iodeto de potássio-KI (P.A.).

Materiais

- 1 béquer de 20 mL
- 1 béquer de 500 mL
- 1 béquer de 1 L
- 1 balão volumétrico de 20 mL
- 1 balão volumétrico de 500 mL
- 1 balão volumétrico de 1 L
- 2 frascos de polietileno de 1 L
- 10 tubos de vidro de 1,5 mm de diâmetro por 10 mm de comprimento
- 10 tubos com capacidade de 2 mL
- 1 micropipeta de volume variável de 0 a 200 µL
- 1 micropipeta de volume variável de 0 a 1.000 µL
- Cubetas de vidro ou de poliestireno

Soluções

Solução de hidróxido de sódio 6 mol. L⁻¹ – dissolver em um béquer de 500 mL, 120 g de hidróxido de sódio (NaOH) em 300 mL de água destilada, deixar esfriar até a temperatura ambiente, transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL e completar o volume com água destilada. Colocar a solução em um frasco de polietileno. Não colocar a solução de base em frascos de vidro.

Reativo de biureto – em um béquer de 1 L, dissolver 3 g de sulfato de cobre penta-hidratado (CuSO₄.5H₂O) em mais ou menos 500 mL de água destilada, adicionar 9 g de tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado (KOOC-(CHOH)₂-COONa.4H₂O) e 5 g de iodeto de potássio (KI). Adicionar 100 mL da solução de hidróxido de sódio 6 mol/L⁻¹ e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1 L e completar o volume com água destilada. Colocar a solução em um frasco de polietileno. O iodeto de potássio pode ser omitido nesta solução caso você deseje. Entretanto, ele aumenta a durabilidade da solução, podendo ser utilizada por vários meses. A solução de biureto deve ser descartada caso fique turva ou apresente um precipitado preto ou avermelhado.

Solução-padrão de albumina sérica bovina-BSA (fração V) ($60,0 \text{ gL}^{-1}$) – em um béquer de 20 mL, dissolver 1,200 g de BSA com água destilada, transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 20 mL e completar o volume. Esta solução deve ser separada em alíquotas em tubos com capacidade de 1,5 mL ou 2,0 mL e armazenada em *freezer* a -18°C .

Metodologias

Curva-Padrão – numerar 6 tubos de ensaio de 0 a 5 e adicionar os volumes de 0,0; 40; 80; 120; 160 e 200 μL de BSA $60,0 \text{ gL}^{-1}$ e os volumes de 200; 160; 120; 80; 40; e 0,0 μL de água destilada, respectivamente. Adicionar em todos os tubos 1,8 mL do reativo de biureto e agitar todos os tubos. As concentrações finais de BSA em cada tubo serão: 0,0; 1,2; 2,4; 3,6; 4,8 e $6,0 \text{ gL}^{-1}$, respectivamente. Aquecer por 10 minutos a 37°C e esperar 10 minutos para a leitura. Fazer a leitura da absorbância em 540 nm contra o branco ($0,0 \text{ gL}^{-1}$). A curva-padrão não precisa ser feita em todas as análises; no entanto, é conveniente fazê-la pelo menos uma vez por semana. Contudo, em todas as análises um padrão tem que ser feito junto com as amostras.

Determinação de proteínas totais em soro ou plasma sanguíneo – numerar três tubos de ensaio como B, A e P. Adicionar 50 μL de água destilada no tubo B; 50 μL de plasma ou soro sanguíneo no tubo A e 50 μL da solução-padrão de BSA ($60,0 \text{ g.L}^{-1}$) no tubo P. Adicionar 50,0 μL de água destilada nos tubos A e P. Adicionar em todos os tubos 1,9 mL do reativo de biureto e agitar. Aquecer por 10 minutos a 37°C e esperar 10 minutos para leitura. Fazer a leitura da absorbância em 540 nm contra o branco (tubo B). Caso haja mais de uma amostra de plasma ou soro sanguíneo, numerar de acordo com notação própria. A concentração das proteínas totais pode ser calculada de acordo com a equação 1.

Equação 1

$$\text{Proteínas totais em g/L} = (\text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{padrão}}) \times 60,0$$

Determinação de proteínas totais em tecido animal – numerar três tubos de ensaio como B, A e P. Adicionar 500 μL de água destilada no tubo B; 500 μL de homogeneizado do tecido no tubo A e 100 μL da solução-padrão de BSA ($60,0 \text{ gL}^{-1}$) no tubo P mais 400 μL de água destilada. Adicionar em todos os tubos 2 mL do reativo de biureto e agitar. Aquecer por 10 minutos a 37°C e esperar 10 minutos em temperatura ambiente. Fazer a leitura da

absorbância em 540 nm contra o branco (tubo B). Caso haja mais de uma amostra, numerá-los de acordo com sua anotação. A concentração das proteínas totais pode ser calculada de acordo com a equação 2.

Equação 2

$$\text{Proteínas totais em mg/g de tecido} = (\text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{padrão}}) \times (\text{massa de tecido em gramas}) \times 120$$

Identificação de peptídeos e proteínas – numerar três tubos de ensaio como B, A e P. No tubo B adicionar 500 μL de água destilada, no tubo A 500 μL da amostra e no tubo P 100 μL da solução-padrão de BSA (60 gL^{-1}) mais 400 μL de água destilada. Adicionar em todos os tubos 2 mL do reativo de biureto e agitar. Aquecer por 10 minutos a 37°C e esperar 10 minutos em temperatura ambiente. Fazer a leitura da absorbância em 540 nm contra o branco (tubo B). A concentração das proteínas totais pode ser calculada de acordo com a equação 3.

Equação 3

$$\text{Concentração em termos de BSA (g/L)} = (\text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{padrão}}) \times 12,0$$

Método de Bradford

Princípio

O método de Bradford (Bradford, 1976), também conhecido por método de *coomassie brilliant blue* (G-250), é baseado na interação entre a forma aniônica do corante G-250 e macromoléculas de proteínas com aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas.

Vantagens e Desvantagens

O método de Bradford possui diversas vantagens, sendo que a principal é sua grande sensibilidade para proteínas e é um dos poucos métodos propostos que efetivamente determinamos proteínas, ou seja, o corante é sensível somente a macromoléculas, portanto aminoácidos ou peptídeos não interferem. Este método é ideal para a determinação do conteúdo de nitrogênio proteico em amostras. Podemos também citar outras vantagens desta metodologia: pode ser automatizada, tem procedimento rápido e fácil, não está sujeita a muitos interferentes e o produto de reação é estável. No entanto, dois problemas podem ser citados sobre esta metodologia, um deles diz respeito à baixa absorvância específica para proteínas de baixo peso molecular.

Dependendo da procedência do corante G-250, a reação pode não se mostrar adequada, pois seu grau de pureza é importante para se obter boa reprodutibilidade dos resultados. A baixa absorvidade específica obtida da interação entre o corante G-250 e proteínas de baixo peso molecular dificulta a utilização desta metodologia nestes casos. O caso mais estudado é o da determinação de proteínas totais em amostras de urina, em que Marshall e Williams (2000) recomendam a utilização de um padrão constituído de proteínas urinárias em vez de albumina de soro humano. Assim, neste caso, recomendamos a utilização de outras metodologias. A questão da baixa solubilidade de algumas proteínas pode ser resolvida de diversas maneiras, como, adição de detergentes ou hidróxido de sódio ou fenol ou aquecer com ureia e mercaptoetanol (Zaia et al., 1998). Quanto ao problema do grau de pureza do corante G-250, recomendamos para cada lote novo do corante que for ser utilizado que se faça uma padronização da metodologia.

Interferentes

Como já dissemos, o método de Bradford não está sujeito à interferência de muitas substâncias. Normalmente, o que ocorre é uma reação entre o interferente e o corante G-250, acarretando, com isso, um aumento da absorbância e fornecendo um resultado falso-positivo ou uma reação entre a proteína e o interferente, impedindo que ela reaja com o corante. Zaia et al. (1998) compilaram uma lista da literatura dos diversos interferentes. Alguns interferentes devem ser destacados, pois, comumente, podem estar presentes na amostra, sendo eles: detergentes (triton X-100, SDS, *tween*-20) reagem com o corante resultando em falso positivo, polifenóis ou polifenóis oxidases reagem com proteínas impedindo sua reação com o corante, ureia fornece resultado falso-positivo na concentração acima de 45 gL^{-1} , glicerol provoca resultado falso-positivo e lipídios causam turbidez nas amostras.

Aplicações da Metodologia

Devido a sua alta sensibilidade para proteínas, o método de Bradford tem sido utilizado para a determinação de proteínas totais em diversos meios (plasma e soro sanguíneo, tecido vegetal, leite, líquido, saliva humana, produtos alimentícios etc.). No entanto, recomendamos cautela na utilização desta metodologia, pois sempre devemos verificar se o meio não possui proteínas de baixo peso molecular, pois o corante não é sensível a elas; neste caso, recomendamos a utilização de outra

metodologia. Temos recomendado o método de Bradford para a determinação de proteínas totais em leite (Kamizake et al., 2003) e plasma sanguíneo (Zaia et al., 2005). Citaremos neste capítulo a aplicação deste método para leite, plasma sanguíneo, identificação de proteínas de tecido animal.

Faixa de Linearidade e Estabilidade

Utilizando a albumina de sérica bovina (fração V), temos trabalhado com a faixa de concentração de proteína de 1 a 5 µg/mL . O produto de reação entre o reativo de Bradford e proteínas é estável por uma hora. Recomendamos sempre utilizar o corante *coomassie brilliant blue* G-250 de uma única companhia e, quando for utilizar um novo lote do corante, que seja feita uma comparação das absorbâncias do padrão entre o antigo e o novo lote, visto que, dependendo da procedência do corante, os resultados podem ser diferentes.

Reagentes

- Albumina sérica bovina-fração V (BSA).
- Caseína.
- *Coomassie brilliant blue* G-250.
- Etanol- $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (P.A.)
- Ácido fosfórico- H_3PO_4 (P.A.).

Materiais

- 2 béqueres de 20 mL
- 1 béquer de 100 mL
- 2 balões volumétricos de 20 mL
- 1 balão volumétrico de 1 L
- 1 frasco de vidro âmbar de 1 L
- 10 tubos de vidro de 1,5 mm de diâmetro por 10 mm de comprimento
- 10 tubos com capacidade de 2 mL
- 1 micropipeta de volume variável de 0 a 20 µL
- 1 micropipeta de volume variável de 0 a 100 µL
- 1 micropipeta de volume variável de 0 a 200 µL
- 1 micropipeta de volume variável de 0 a 1.000 µL
- 1 micropipeta de volume variável de 0 a 5.000 µL
- Cubetas de vidro

Soluções

Solução do corante *coomassie brilliant blue* G-250 – em um béquer de 100 mL dissolver 100 mg do corante em 50 mL de etanol, transferir esta solução para um balão volumétrico de 1 L e adicionar 100 mL de ácido fosfórico a 85% (m/v). Completar o volume do balão com água destilada. Armazenar esta solução em um frasco de vidro âmbar.

Solução-padrão de albumina sérica bovina-BSA (fração V) (2,00 gL⁻¹) – em um béquer de 20 mL, dissolver 0,0400 g de BSA com água destilada, transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 20 mL e completar o volume. Esta solução deve ser separada em alíquotas em tubos com capacidade de 1,5 mL ou 2,0 mL e armazenada em *freezer* a -18°C.

Solução-padrão de caseína (2,00 g L⁻¹) – em um béquer de 20 mL, dissolver 0,0400 g de caseína em hidróxido de sódio 0,10 mol L⁻¹, transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 20 mL e completar o volume com hidróxido de sódio 0,10 mol L⁻¹. Esta solução deve ser separada em alíquotas em tubos com capacidade de 1,5 mL ou 2,0 mL e armazenada em *freezer* a -18°C.

Metodologias

Curva-padrão de BSA ou caseína – em um tubo de ensaio adicionar 200 µL da proteína (BSA ou caseína) 2,00 gL⁻¹ e 1,80 mL de água destilada. Numerar 6 tubos de ensaio de 0 a 5, adicionar os seguintes volumes de BSA ou caseína previamente diluídas (0,200 gL⁻¹) em cada um: 0,0; 25; 50; 75; 100 e 125 µL. Após, adicionar os seguintes volumes de água destilada 125; 100; 75; 50; 25; e 0,0 µL. Adicionar em todos os tubos 5 mL do corante *coomassie brilliant blue* G-250 e agitar todos os tubos. As concentrações finais de BSA ou caseína em cada tubo serão: 0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 µg mL⁻¹. Esperar 10 minutos e fazer a leitura da absorbância em 595 nm contra o branco (0,0 µg mL⁻¹). A curva-padrão não precisa ser feita em todas as análises, no entanto é conveniente fazê-la pelos menos uma vez por semana. Contudo, em todas as análises um padrão tem que ser feito junto com as amostras.

Determinação de proteínas totais em soro ou plasma sanguíneo – transferir para um tubo de ensaio 10 µL de plasma ou soro sanguíneo e diluir para 2 mL com água destilada. Numerar três tubos de ensaio como B, A e P. Adicionar 50 µL de água destilada no tubo B; 50 µL plasma ou soro sanguíneo no tubo A e 50 µL da solução-padrão de BSA (0,200 g/L) no tubo P. Para todos os

tubos, completar o volume para 5 mL com o corante *coomassie brilliant blue* G-250 e agitar todos os tubos. Esperar 10 minutos e fazer a leitura da absorbância em 595 nm contra o branco (0,0 µg mL⁻¹). A concentração das proteínas totais pode ser calculada de acordo com a equação 4.

Equação 4

Proteínas totais em g. L⁻¹ = $(\text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{padrão}}) \times 40,0$

Determinação de proteínas totais em tecido animal – adicionar 20 µL do homogeneizado de tecido em um tubo e completar o volume para 1 mL com solução salina. Numerar três tubos de ensaio como B, A e P. Adicionar 100 µL de água destilada no tubo B; 100 µL homogeneizado do tecido previamente diluído no tubo A e 100 µL da solução-padrão de BSA (0,200 g. L⁻¹) no tubo P. Para todos os tubos completar o volume para 5 mL com o corante *coomassie brilliant blue* G-250 e agitar todos os tubos. Esperar 10 minutos e fazer a leitura da absorbância em 595 nm contra o branco (0,0 µg mL⁻¹). A concentração das proteínas totais pode ser calculada de acordo com a equação 5.

Equação 5

Proteínas totais em mg. g⁻¹ de tecido = $(\text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{padrão}}) \times (\text{massa de tecido em gramas}) \times 100$

Determinação de proteínas totais em tecido nervoso (*micropunch*) – numerar três tubos de ensaio como B, A e P. Adicionar 100 µL de água destilada no tubo B; 20 µL homogeneizado do tecido nervoso no tubo A e 100 µL da solução-padrão de BSA (0,200 g. L⁻¹) no tubo P. Adicionar 80 µL de água destilada no tubo A. Para todos os tubos completar o volume para 5 mL com o corante *coomassie brilliant blue* G-250 e agitar todos os tubos. Esperar 10 minutos e fazer a leitura da absorbância em 595 nm contra o branco (0,0 µg. mL⁻¹). A concentração das proteínas totais pode ser calculada de acordo com a equação 6.

Equação 6

Proteínas totais em µg = $(\text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{padrão}}) \times 200$

Identificação de proteínas – numerar três tubos de ensaio como B, A e P. No tubo B adicionar 50 µL de água destilada, no tubo A 50 µL da amostra e no tubo P 100 µL da solução-padrão de BSA (0,200 g L⁻¹). Para todos os tubos completar o volume para 5 mL com o corante *coomassie brilliant blue* G-250, agitar, esperar 10 minutos e fazer a leitura da absorbância em 595

nm contra o branco ($0,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). A concentração das proteínas totais pode ser calculada de acordo com a equação 7.

Equação 7

$$\text{Proteínas totais em } \mu\text{g. mL}^{-1} = (\text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{padrão}}) \times 2$$

Determinação de proteínas totais em amostras de leite

– pesar 0,0200 g de leite em pó e dissolver em 100 mL de NaOH a $0,10 \text{ mol. L}^{-1}$. Numerar três tubos de ensaio como B, A e P. Adicionar 100 μL de água destilada no tubo B; 100 μL da amostra de leite previamente diluída no tubo A e 100 μL da solução-padrão de caseína ($0,200 \text{ g. L}^{-1}$) no tubo P. Para todos os tubos completar o volume para 5 mL com o corante *coomassie brilliant blue G-250*, agitar, esperar 10 minutos e fazer a leitura da absorbância em 595 nm contra o branco ($0,0 \mu\text{g. mL}^{-1}$). A concentração das proteínas totais pode ser calculada de acordo com a equação 8.

Equação 8

$$\text{Proteínas totais em \% (m/m)} = (\text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{padrão}}) \times (\text{massa de leite em gramas})$$

Método de Lowry

Princípio

O princípio do método de Lowry baseia-se no reativo de Folin-Ciocalteu (mistura de molibdato mais tungstato mais ácido fosfórico), o qual sofre uma redução quando reage com proteínas na presença do catalisador de Cu (II). Chou e Goldstein (1960) e Legler et al. (1985) estudaram o mecanismo de redução do reativo de Folin-Ciocalteu por proteínas, peptídeos e aminoácidos. Estes autores concluíram que esta redução ocorre diretamente por meio das cadeias laterais de alguns aminoácidos (tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina), que contribuem com quatro elétrons para a redução do reativo de Folin-Ciocalteu ou por meio da retirada de dois elétrons de cada unidade tetrapeptídica dos peptídeos e proteínas, que é facilitada pela formação do complexo entre o Cu (II) e peptídeos/proteínas.

Vantagens e Desvantagens

A principal vantagem do método de Lowry é sua alta sensibilidade a proteínas, e outra é que a absorvidade específica não é muito variável para diferentes proteínas. Porém, o método de Lowry possui diversas desvantagens, tais como estar sujeito a muitos interferentes, possuir uma faixa estreita de concentração de

proteínas em que a lei de Beer-Lambert é seguida e o tempo de análise não é muito curto.

Interferentes

O método de Lowry está sujeito a diversos interferentes, sendo que estes normalmente causam um aumento da absorvidade do branco, diminuição da absorvidade específica ou a formação de algum tipo de precipitado. Zaia et al. (1998) fizeram uma lista dos interferentes desta metodologia, sendo os principais: compostos fenólicos, açúcares, tampão Tris-HCl, mercaptanas, ácido úrico, guanina, melanina, sendo que todas estas substâncias reagem com o reativo de Folin-Ciocalteu provocando resultado falso-positivo; lipídios aumentam a turbidez das amostras; detergentes provocam a formação de precipitados; sulfato de amônio altera o pH da amostra provocando diminuição da absorvidade; e RNA aumenta a absorção da amostra.

Aplicações da Metodologia – apesar de todos os inconvenientes já citados, o método de Lowry continua sendo o mais utilizado, provavelmente devido ao fato de ter sido o primeiro método com grande sensibilidade a proteínas a ser proposto, e isto criou uma tradição na utilização desta metodologia. Este método tem sido utilizado na determinação de proteínas totais em: líquido, plasma sanguíneo, tecido animal e vegetal, saliva humana, membranas, leite humano, suco biliar e produtos alimentícios (Zaia et al., 1998). Descreveremos aqui a utilização desta metodologia na determinação de proteínas totais em tecidos, pois este método é ainda muito utilizado em laboratórios de pesquisa.

Faixa de Linearidade e Estabilidade – um dos inconvenientes da utilização da metodologia proposta por Lowry refere-se ao fato de que a lei de Beer-Lambert é seguida em estreita faixa de concentração de proteína. Em nosso laboratório, temos utilizado a BSA na concentração de $20\text{--}60 \mu\text{g. mL}^{-1}$. O produto de reação entre o reativo de Folin-Ciocalteu e proteínas é estável por diversas horas; no entanto, recomendamos que a absorbância seja lida no máximo em 2 horas.

Reagentes

- Folin-Ciocalteu.
- Albumina sérica bovina - fração V (BSA).
- Carbonato de sódio – Na_2CO_3 (P.A.).
- Hidróxido de sódio – NaOH (P.A.).

- Sulfato de cobre penta-hidratado – $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (P.A.).
- Tartarato de sódio ou potássio – $\text{KOOOC}-(\text{CHOH})_2-\text{COONa}$ (P.A.).
- Fenolftaleína.
- Etanol.
- Ftalato ácido de potássio.

Materialis

- 1 béquer de 20 mL
- 3 béqueres de 100 mL
- 1 béquer de 500 mL
- 1 bureta 25 mL
- 2 erlenmeyers de 250 mL
- 1 balão volumétrico de 20 mL
- 1 balão volumétrico de 1 L
- 1 balão volumétrico de 100 mL
- 1 frasco de vidro de 1 L
- 10 tubos de vidro de 1,5 mm de diâmetro por 10 mm de comprimento
- 10 tubos com capacidade de 2 mL
- 1 micropipeta de volume variável de 0 a 200 μL
- 1 micropipeta de volume variável de 0 a 1.000 μL
- Cubetas de vidro

Soluções

Solução-padrão de albumina sérica bovina-BSA (fração V) (1,00 g. L^{-1}) – em um béquer de 20 mL, dissolver 0,0200 g de BSA com água destilada, transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 20 mL e completar o volume. Esta solução deve ser separada em alíquotas em tubos com capacidade de 1,5 mL ou 2,0 mL e armazenada em *freezer* a -18°C .

Solução de hidróxido de sódio 1 mol. L^{-1} – em um béquer de 500 mL, dissolver 40 g de hidróxido de sódio com água destilada, transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1 L e completar o volume. Colocar a solução em um frasco de polietileno. Não colocar a solução de base em frascos de vidro. Esta solução deverá ser padronizada e será utilizada na titulação do reagente de Folin-Ciocalteu.

Solução de hidróxido de sódio 0,10 mol. L^{-1} – em um béquer de 500 mL, dissolver 4 g de hidróxido de sódio com água destilada, transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1 L e completar o volume. Colocar a solução em um frasco de polietileno. Não colocar a solução de base em frascos de vidro.

Solução de fenolftaleína a 1% – dissolver 0,500 g de fenolftaleína em 30 mL de etanol e completar o volume para 50 mL com água destilada.

Solução-padrão de ftalato ácido de potássio 0,100 mol. L^{-1} – secar o ftalato ácido de potássio puro a $110-120^\circ\text{C}$ por 30 minutos e pesar exatamente 2,0430 g, dissolver em água quente a $50-70^\circ\text{C}$ (previamente fervida e eliminado o gás carbônico) e completar o volume para 100 mL em um balão volumétrico com água destilada (previamente fervida) a temperatura ambiente.

Reagente A – pesar 10 g de carbonato de sódio e dissolver em 500 mL de hidróxido de sódio 0,10 mol. L^{-1} .

Reagente B – dissolver 0,50 g de sulfato de cobre penta-hidratado e 1 g tartarato de sódio ou potássio em 100 mL de água destilada.

Reagente C – misturar 50 mL do reagente A com 1 mL do reagente B. Esta solução poderá ser utilizada até 24 horas após sua preparação.

Reagente D – misturar 50 mL de uma solução de carbonato de sódio a 2% com 1 mL do reagente B.

Reagente E – titular o reagente de Folin-Ciocalteu com hidróxido de sódio (1 mol. L^{-1}), previamente padronizado com ftalato ácido de potássio, utilizando a fenolftaleína como indicador e diluí-lo até que sua concentração em termos de ácido seja de 1,0 mol. L^{-1} (cerca de duas vezes). Este reagente deve ser preparado minutos antes de sua utilização e depois descartado.

Metodologias

Padronização do hidróxido de sódio 1 mol. L^{-1} – pipetar 10 mL do hidróxido de sódio 1 mol. L^{-1} e diluir para 100 mL em balão volumétrico. Transferir cuidadosamente esta solução para uma bureta de 25 mL (cuidado para não ficar bolhas de ar na bureta). Pipetar 20 mL da solução de ftalato ácido de potássio (0,10 mol. L^{-1}) em um erlenmeyer de 250 mL, adicionar 3 gotas de fenolftaleína e 100 mL de água destilada. Agitando constantemente a solução de ftalato, gotejar o hidróxido sobre ela, até que a

solução se torne rósea. Anotar o volume gasto e calcular a molaridade do hidróxido utilizando a equação 9.

Equação 9

Concentração de hidróxido de sódio (mol. L^{-1}) = $0,10 \times 20/\text{volume de NaOH em mL}$

Curva padrão de BSA – numerar 5 tubos de ensaio de 0 a 4, adicionar os seguintes volumes de BSA ($1,00 \text{ g. L}^{-1}$) em cada um 0,0; 20; 40; 60; e 80 μL . Após, adicionar os seguintes volumes de água destilada: 80; 60; 40; 20; e 0,0 μL . Adicionar em todos os tubos 1 mL do reagente C, misturar e deixar em repouso à temperatura ambiente por pelo menos 10 minutos. Adicionar 100 μL do reagente E, misturar imediatamente (o tempo entre a adição do reagente e sua total mistura não deve ser maior que 2 segundos) e deixar em repouso à temperatura ambiente por pelo menos 30 minutos. Fazer a leitura da absorbância em 750 nm contra o branco ($0,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). As concentrações finais de BSA em cada tubo serão: 0,0; 16,7; 33,3; 50,0 e 66,7 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. A curva-padrão não precisa ser feita em todas as análises, no entanto, é conveniente fazê-la pelos menos uma vez por semana. Contudo, em todas as análises um padrão tem que ser feito junto com as amostras.

Determinação de proteínas totais em tecido animal – adicionar 100 μL do homogeneizado de tecido em um tubo e completar o volume para 1 mL com salina. Numerar três tubos de ensaio como B, A e P. Adicionar 60 μL de água destilada no tubo B; 60 μL homogeneizado do tecido previamente diluído no tubo A e 60 μL da solução-padrão de BSA (1 g. L^{-1}) no tubo P. Adicionar em todos os tubos 1 mL do reagente C, misturar e deixar em repouso à temperatura ambiente por pelo menos 10 minutos. Adicionar 100 μL do reagente E, misturar imediatamente (o tempo entre a adição do reagente e sua total mistura não deve ser maior que 2 segundos) e deixar em repouso à temperatura ambiente por pelo menos 30 minutos. Fazer a leitura da absorbância em 750 nm contra o branco ($0,0 \mu\text{g. mL}^{-1}$). A concentração das proteínas totais pode ser calculada de acordo com a equação 10.

Equação 10

Proteínas totais em mg g^{-1} de tecido = $(\text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{padrão}}) \times (\text{massa de tecido em gramas}) \times 100$

Considerações Gerais sobre algumas Metodologias Espectrofotométricas

Descreveremos rapidamente algumas metodologias que não são tão comumente utilizadas como as descritas

nos itens anteriores. Entretanto, em algumas situações, elas podem ser uma opção a ser utilizada.

Método de Absorção no Ultravioleta

Princípio

Na região de 280 nm as proteínas absorvem, devido à presença de alguns aminoácidos em sua composição, como: triptofano, tirosina e cistina, devido a sua alta absorvidade molar. Outros aminoácidos (fenilalanina, cisteína, metionina) também absorvem nesta região, no entanto, sua absorvidade molar é baixa. Na região abaixo de 220 nm, as proteínas também apresentam forte absorção devido à ligação peptídica (Stoscheck, 1990, Zaia et al. 1998).

Vantagens e Desvantagens

A principal vantagem das metodologias utilizando o ultravioleta é que não é necessário fazer-se nenhum preparo da amostra. A grande desvantagem é que estes métodos sofrem interferência de qualquer substância que absorva no ultravioleta, o que torna limitada sua utilização (Stoscheck, 1990, Zaia et al. 1998).

Interferentes

Qualquer substância que absorva no ultravioleta é um interferente destas metodologias (Stoscheck, 1990, Zaia et al. 1998).

Aplicações das Metodologias

As metodologias utilizando o ultravioleta são comumente utilizadas durante os procedimentos de purificação e separação de proteínas (Stoscheck, 1990, Zaia et al. 1998).

Método do p-cloranil

Princípio

A reação entre quinonas e aminoácidos ou proteínas é objeto de muita discussão na literatura, sendo que basicamente existem duas correntes. Em uma é descrita ocorrência da formação de compostos mono ou dissubstituídos dos aminoácidos nas quinonas e na outra é proposta a formação de compostos de transferência de carga (Slifkin, 1980). Na metodologia desenvolvida por Zaia et al. (1999), utilizando o p-cloranil, provavelmente um composto de transferência de carga esteja sendo formado.

Vantagens e Desvantagens

O método proposto possui a vantagem de ser simples e sensível para a maioria das aplicações para a determinação de proteínas totais em meios biológicos. No entanto, possui a desvantagem de a absorvidade específica variar dependendo da proteína.

Interferentes

Qualquer substância que reaja com o p-cloranil é um interferente em potencial do método. Zaia et al. (1999) testaram alguns possíveis interferentes desta metodologia.

Aplicações da Metodologia

O p-cloranil foi utilizado com sucesso para a determinação de proteínas totais nas seguintes amostras: plasma sanguíneo (Zaia et al., 1999), tecido de epididímo (Zaia et al., 2000) e soro de leite (Kamizake et al., 2003).

Método de Smith ou BCA

Princípio

O método de Smith ou BCA-ácido bicinchonínico (4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolína) é baseado na reação entre cobre (II) e proteínas em meio alcalino, produzindo cobre (I) que reage com BCA absorvendo fortemente na região de 560 nm (Smith et al., 1985)

Vantagens e Desvantagens

O método de Smith ou BCA tem a vantagem de ser simples e ter sensibilidade igual ao método de Lowry. Porém, tem as seguintes desvantagens: variação da absorvidade específica para diferentes proteínas, variação da absorbância com o tempo e dependência entre temperatura de incubação das amostras e sua absorbância.

Interferentes

Diversas substâncias podem interferir no método de Smith, sendo que em muitos casos estas substâncias reagem com o cobre (II). Zaia et al. (1998) fizeram uma lista da literatura dos interferentes do método de Smith. Os mais comuns são: EDTA, ácido ascórbico, penicilinas, paracetamol etc.

Aplicações da Metodologia

O método de Smith tem sido recomendado para a determinação de proteínas totais em leite humano e células.

Referências

- Beyer, R.E. A rapid biuret assay for protein of whole fatty tissues *Anal. Biochem.*, 129:483-485, 1983.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254, 1976.
- Chmelka, B.F.; Pines, A. Some developments in nuclear magnetic resonance of solids. *Science*, 246:71-77, 1989.
- Chou, S.; Goldstein, A. Chromogenic grouping in the Lowry protein determination. *Biochem J.*, 75:109-115, 1960.
- Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S. Introdução a Métodos Cromatográficos. 6ª ed., UNICAMP, Campinas, 1995.
- Cunniff, P.A. (ed.). Official Methods of Analysis of AOAC International. 16ª ed., AOAC International, Arlington-VA, 1995.
- Fenn, J.B.; Mann, M.; Meng, C.K.; Wong, S.F.; Whitehouse, G.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246:64-70, 1989.
- Gornall, A.G.; Bardawill, C.J.; David, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177:751-766, 1949.
- Heyrovsky, J.; Kuta, J. Principles of Polarography. Academic Press, New York, 1966.
- Huheey, J.E.; Keiter, E.A.; Keiter, R.L. Inorganic Chemistry-Principles of Structure and Reactivity, 4th ed., Harper Collins Publishers, New York, 1993.
- Jeffery, G.H.; Bassett, J.; Mendham, J.; Denney, R.C. Vogel: A. I. Análise Química Quantitativa, 5ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1992, pp. 521-545.
- Kamizake, N.K.K.; Gonçalves, M.M.; Zaia, C.T.B.V.; Zaia, D.A.M. Determination of total proteins in cow milk samples: a comparative study between the Kjeldahl method and the spectrophotometric methods. *J. Food Comp. and Anal.*, 16:507-516, 2003.
- Legler, G.; Muller-Platz, C.M.; Meniges-Hetikamp, M.; Pfeieger, G.; Julich, C. On the chemical basis of the Lowry protein determination. *Anal. Biochem.*, 150:278-287, 1985.
- Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. Princípios de Bioquímica. 2ª ed., Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda, São Paulo, 2000.
- Marshall, T.; Williams, K.M. Total protein determination in urine: elimination of a differential response between the coomassie blue and pyrogallol red protein dye-binding assays. *Clin. Chem.*, 46:392-398, 2000.

- McClure, W.F. Near-infrared spectroscopy: The giant is running strong. *Anal. Chem.*, 66:43A-53A, 1994.
- Ohlweiler, O.A. *Química Analítica Quantitativa*. Vol. 3, 2º ed., Livros Técnicos e Científicos Editora, Rio de Janeiro, 1980, pp. 665-746.
- Palkovits, M. Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. *Brain Res.*, 59:449-450, 1973.
- Slifkin, M.A. The significance of charge transfer interactions in biology in *Molecular Interactions*, Ratajczak, H. e Orville-Thomas, W.J. eds., vol. 2, Wiley, New York, 1980.
- Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150:76-85, 1985.
- Stoscheck, C.M. General methods for handling proteins and enzymes: quantitation of proteins. In Deutscher, M.P., ed.; *Methods in Enzimology*. Academic Press Inc., New York, 1990.
- Tavares, M.F.M. Capillary electrophoresis: basic concepts. *Química Nova*, 19:173-181, 1996.
- Zaia, D.A.M.; Marques, F.R.; Zaia, C.T.B.V. Spectrophotometric determination of total proteins in blood plasma: a comparative study among dye-binding methods. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 48:385-388, 2005.
- Zaia, D.A.M.; Verri Jr., W.A.; Zaia, C.T.B.V. Determination of total proteins in several tissues of rat: a comparative study among spectrophotometric methods. *Microchem. J.*, 64:235-239, 2000.
- Zaia, D.A.M.; Verri Jr., W.A.; Zaia, C.T.B.V. Determination of total proteins: a study of reaction between quinones and proteins. *Talanta*, 49:373-376, 1999.
- Zaia, D.A.M.; Zaia, C.T.B.V.; Lichtig, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*, 21:787-793, 1998.
- Waynforth, H.B. *Experimental and Surgical Technique in the Rat*, Academic Press, New York, 1980, p.241.

21. Imunoensaio Enzimático para Detecção de Proteínas

Moacir Carnelós Filho

Introdução

Os imunoensaios combinam princípios de imunologia e química em testes que são utilizados por cientistas de áreas tão diversas como biologia molecular e ciências ambientais. Imunoensaios como *immunoblotting* (detecção de proteínas em membranas) imunoistoquímica (localização de moléculas em tecidos e células) e imunoensaio enzimático proporcionam meios sensíveis e específicos para a detecção de moléculas-alvo.

Dentre as técnicas imunoquímicas, o imunoensaio enzimático é um dos mais sensíveis para a detecção e identificação de proteínas, além de ser rápido, confiável, de mais baixo custo e seguro que outras técnicas. Vários fatores favorecem a escolha desta metodologia: procedimento simples, altas especificidade e sensibilidade, pequenas quantidades de amostra, pequena variação entre os ensaios, redução significativa do tempo de bancada e facilidade na leitura da placa. Basicamente, este ensaio consiste na captura de uma molécula de interesse por

meio de sua ligação a outra molécula imobilizada em suporte sólido, e sua detecção por algum método enzimático. Um tipo bastante comum de imunoensaio enzimático é o teste de ELISA, que será detalhado mais adiante.

O método mais convencional para a imobilização é a adsorção passiva da proteína em superfície plástica, geralmente poliestireno. A superfície do poliestireno não irradiado apresenta força de ligação química de natureza hidrofóbica (Fig. 21.1).

Em estudos clássicos, a dinâmica da adsorção de diferentes proteínas em superfícies de poliestireno é atribuída a alguns fatores, obedecendo tipicamente o princípio da saturação (Fig. 21.2), com a formação de uma monocamada de proteínas. A quantidade de proteína em solução parece estar correlacionada diretamente com a porcentagem de proteína adsorvida na placa, até a concentração de 5 mg/mL. Esta faixa é chamada de região de independência, pois a porcentagem de proteína imobilizada é constante e independente da adição de

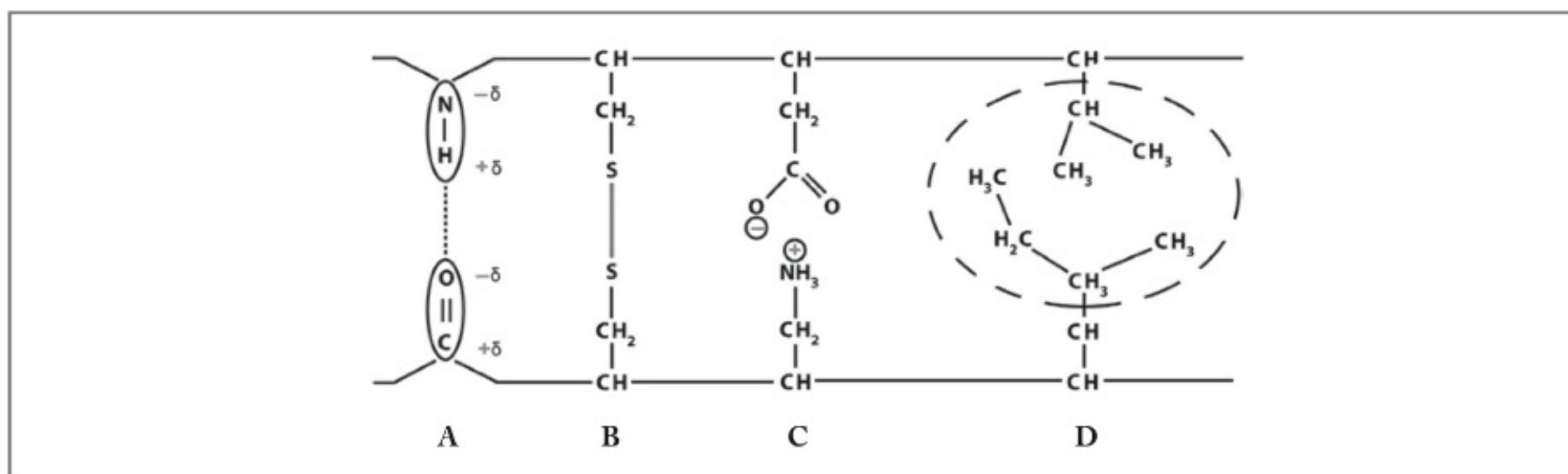


Figura 21.1 – Tipos de ligação entre macromoléculas. Ligações químicas “verdadeiras” são representadas pela ponte de dissulfeto (B) e a ligação eletrostática ou iônica entre um íon do grupo carboxila e um íon do grupo amino (C). Ligações mediadas por forças de van der Waals são representadas pela ligação do hidrogênio entre dois dipolos (A) e a ligação hidrofóbica entre grupos apolares de esqueletos carbônicos voltados para a superfície da molécula (D), em que a área pontilhada indica uma região no qual a água foi excluída.

mais proteína. As proteínas adsorvidas dentro desta região permanecem bem aderidas nas etapas posteriores. Acima desta região, entretanto, a proporção de proteínas imobilizadas é inversa à adicionada. A porcentagem imobilizada varia entre as proteínas.

A adsorção de moléculas funcionais em plásticos provoca uma grande perda de atividade. Para anticorpos, a funcionalidade – a capacidade de ligação ao antígeno após a adsorção – pode reduzir-se a apenas 10% para anticorpos monoclonais e 25% para anticorpos policlonais. Entretanto, esta perda não inviabiliza

o ensaio, pois as moléculas funcionais remanescentes podem responder satisfatoriamente ao nível de sensibilidade desejado.

Teste de ELISA

O acrônimo ELISA significa *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. Neste tipo de imunoensaio, um dos reagentes é imobilizado em um suporte sólido, e a detecção se dá por ação enzimática, produzindo cor, quimioluminescência ou fluorescência.

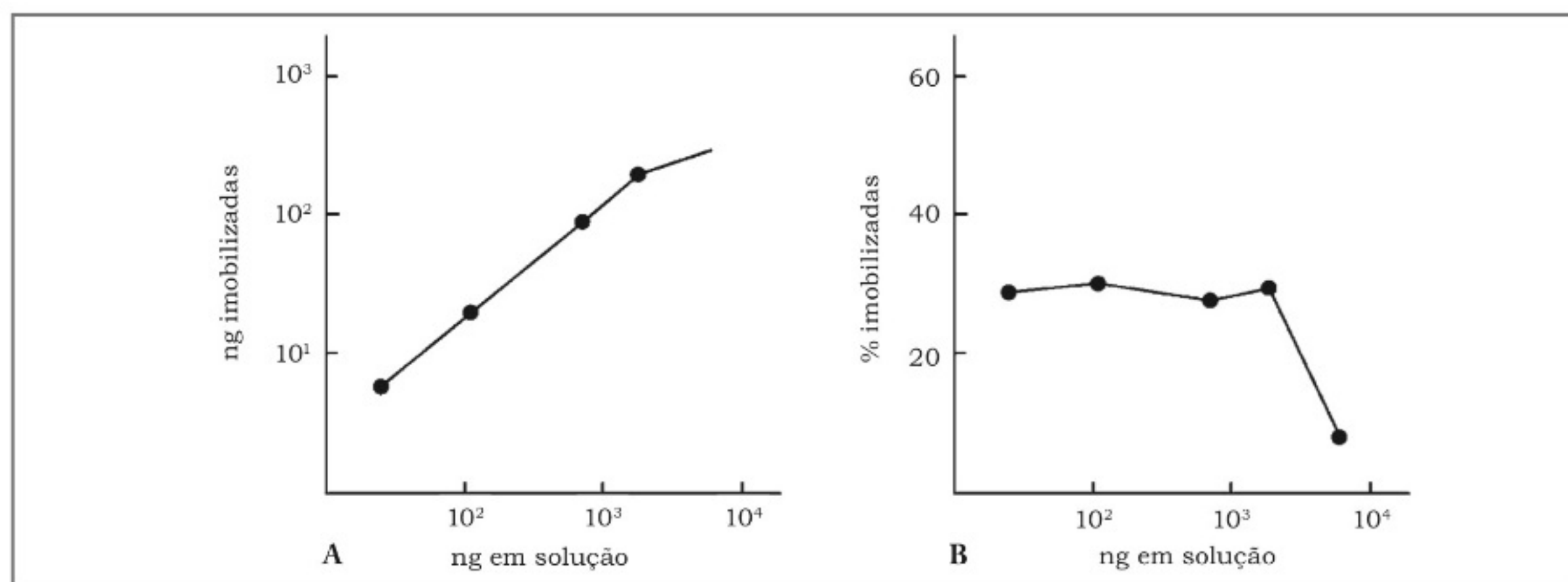


Figura 21.2 – Imobilização de uma proteína em poliestireno.

O teste de ELISA é um imunoensaio chamado *heterogêneo*, pois consiste em duas fases – uma líquida e outra sólida. Há quatro tipos básicos de ELISA: 1. *ELISA direto*, que envolve a imobilização do antígeno na fase sólida, seguida pela detecção com um anticorpo primário conjugado com enzima. Este tipo de ensaio geralmente torna a quantificação em amostras não purificadas mais difícil, pois outras proteínas presentes competem pelos sítios de ligação no plástico. 2. *ELISA indireto*, em que o antígeno também é imobilizado na placa. A detecção, neste caso, dá-se de forma indireta, pois o anticorpo primário não é marcado. Um anticorpo secundário, conjugado com enzima, que reage com o anticorpo primário é usado para a detecção. Este formato é o mais utilizado para a detecção de anticorpos específicos em soro. 3. *ELISA de competição*, baseado na pré-incubação da amostra com antígenos (ou anticorpos) que competem com os anticorpos de captura da placa pelos anticorpos (ou antígenos) desta amostra. A diminuição no sinal no qual há a adição do anticorpo secundário ou antígeno para a detecção proporciona um resultado altamente específico. 4. *ELISA "sandwich"* (Fig. 21.3), nesta técnica o antígeno é imobilizado entre dois

anticorpos primários, o primeiro fixado à microplaca (anticorpo de captura), e o segundo, chamado de anticorpo de detecção, é adicionado após a aplicação da amostra contendo o antígeno. Este segundo anticorpo pode ser conjugado com uma enzima ou ligado posteriormente a um anticorpo secundário conjugado com uma enzima, que catalisa a reação de um substrato cromogênico, gerando cor. O processo descrito acima envolve uma série de passos, mesmo para um ensaio de ELISA com uma configuração simples, tais como: a) cobertura da placa com a proteína de captura (imobilização), b) lavagem da placa para retirada das proteínas que não aderiram à superfície, c) incubação com a amostra contendo o antígeno, d) lavagem da placa para retirada da amostra não ligada à proteína de captura, e) incubação com o anticorpo conjugado com a enzima, f) lavagem da placa para a retirada do anticorpo conjugado não ligado ao antígeno e g) adição do substrato cromogênico. A intensidade da cor desenvolvida pelo substrato é proporcional à quantidade do antígeno presente na amostra. A intensidade pode ser mensurada por um espectrofotômetro, permitindo uma análise quantitativa. Uma variação para este tipo de teste: para a captura do antígeno,

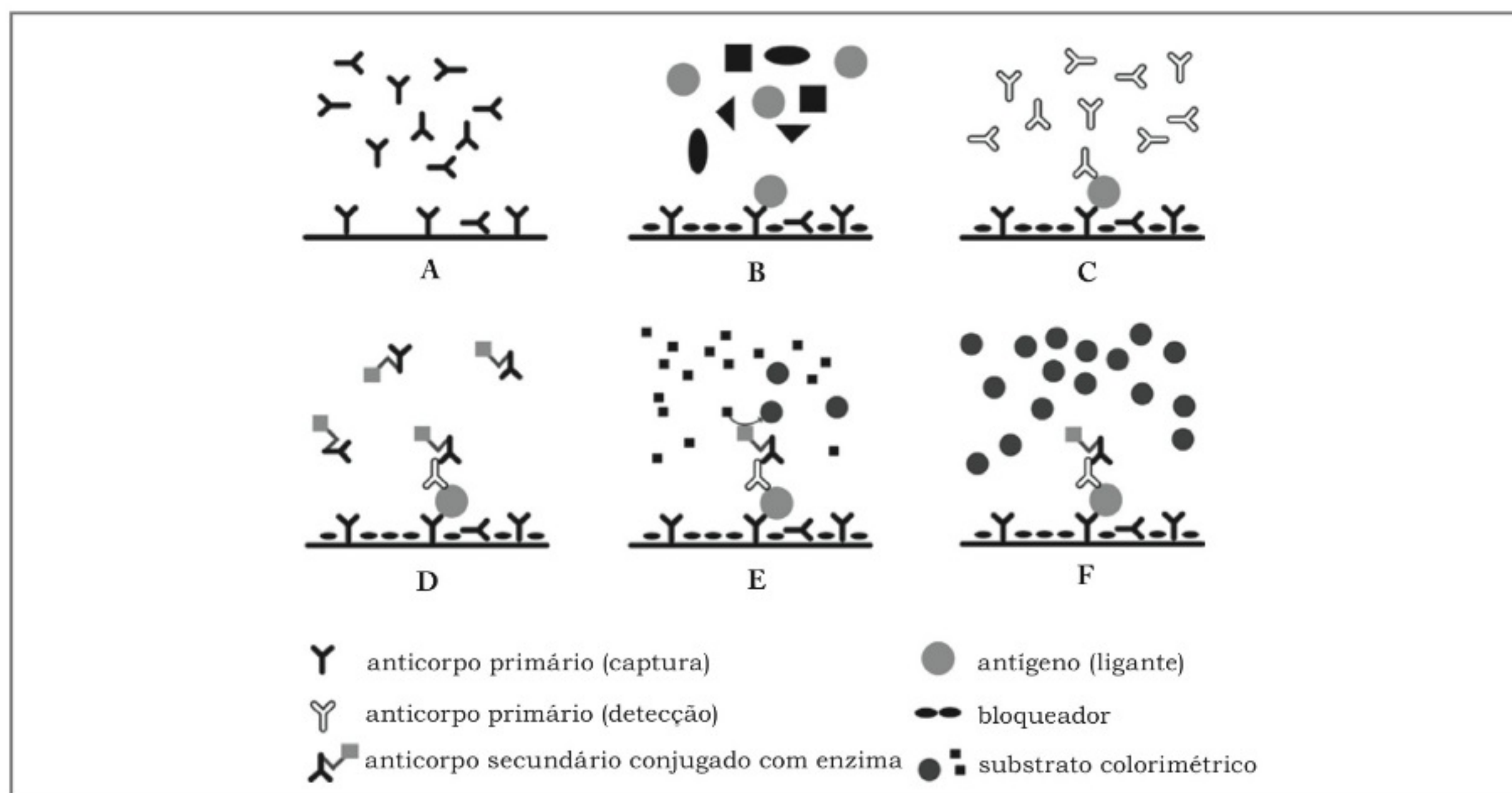


Figura 21.3 – Etapas de um imunoensaio enzimático (ELISA “sanduíche”). (A) Cobertura da placa com anticorpo de captura; (B) aplicação da amostra à placa (já bloqueada) com o antígeno (ligante) presente em várias proteínas; (C) ligação do anticorpo de detecção ao antígeno; (D) ligação do anticorpo secundário conjugado com enzima ao de detecção; (E) a aplicação do substrato; (F) geração de cor a partir do substrato. Entre cada etapa, ocorre a lavagem da placa, para a remoção do excesso de reagente.

uma proteína com afinidade específica ao antígeno pode ser utilizada, em substituição ao anticorpo.

Reagentes

A concentração de cada reagente deve ser estabelecida empiricamente. Felizmente, uma faixa bem abrangente de diluições é possível. Por exemplo, boa parte dos protocolos para ELISA baseados em anticorpos conjuga-

dos com enzima indica diluição de 1:5.000 do conjugado, mas poderia trabalhar igualmente bem com diluições entre 1:2.000 e 1:20.000. Para o estabelecimento dos níveis adequados, uma tabela de titulações deve ser construída. Esta tabela consiste em um único experimento no qual as concentrações de dois componentes variam, como mostra a figura 21.4. Este método pode ser utilizado para a otimização dos reagentes quando é empregado um anticorpo secundário conjugado com enzima. Um dos

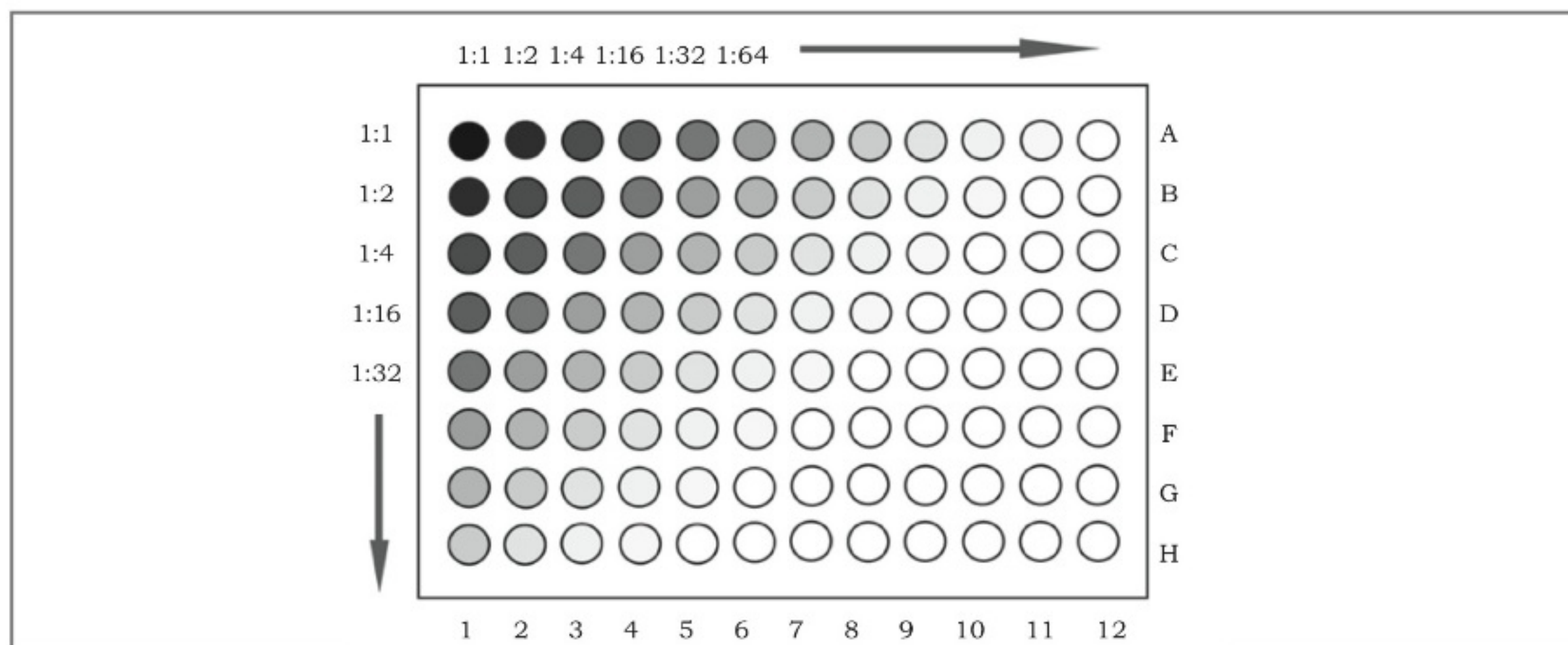


Figura 21.4 – Diluição seriada em duas dimensões (o antígeno é sucessivamente diluído na horizontal, enquanto o anticorpo é igualmente diluído na vertical).

reagentes é diluído horizontalmente (linhas), enquanto outro é diluído verticalmente (colunas). O desenho experimental permite a análise de diferentes concentrações dos dois reagentes em cada poço, para a obtenção da melhor combinação entre ambos. Este procedimento também é chamado de diluição seriada em duas dimensões.

Controles

Para cada ensaio, é importante a determinação dos controles positivo e negativo para assegurar a fidelidade dos resultados, ou seja, que os reagentes estão funcionando de acordo com o esperado, mesmo que o resultado das amostras seja completamente positivo ou negativo.

Os controles devem ainda apresentar uma especificidade apropriada ao teste, para que qualquer reação observada represente uma interação antígeno-anticorpo do sistema estudado e não reações de outra natureza, devido a fatores estranhos ao sistema.

A seguir apresentamos os controles normalmente utilizados em imunoensaios:

- Os poços cobertos apenas com a proteína de bloqueio e os cobertos com a proteína de bloqueio mais o antígeno não devem ligar anticorpos secundários conjugados com a enzima, tampouco degradar o substrato.
- Poços cobertos com a proteína de bloqueio não devem ligar anticorpos primários.
- Soro normal ou antissoro de antígenos não relacionados não devem ligar-se aos poços cobertos com antígeno.
- A ligação do anticorpo nos poços cobertos com antígeno deve ser bloqueada com a incubação prévia deste anticorpo com algum antígeno homólogo, mas não com a incubação com outro tipo de antígeno (controle de adsorção do antígeno).

Bloqueio

Tampões de bloqueio são utilizados para reduzir as ligações inespecíficas. Para cada ensaio é necessário que diferentes tipos de bloqueadores sejam testados, pois não há um bloqueador universal para todos os imunoensaios. A otimização do bloqueio requer monitoração do ruído (controle negativo) e sinal (controle positivo) para comparação e seleção dos bloqueadores. Escolher o bloqueador que produzir a relação sinal/ruído mais alta. Há dois tipos principais de bloqueadores: *detergentes* e *proteínas*. O detergente mais utilizado é o *Tween*[®] 20, na concentração entre 0,01 e 0,1%. Os bloqueadores

proteicos mais comuns são soro normal (controle), leite desnatado, albumina sérica bovina (BSA) e caseína. O leite desnatado é bastante utilizado, porém a presença de biotina no leite e de fosfoproteínas em quantidades variáveis torna sua utilização não recomendável em sistemas baseados na afinidade avidina/biotina, ou para ensaios envolvendo fosforilação, como na sinalização celular, por exemplo. Há disponível no mercado uma série de bloqueadores proteínicos que reduzem significativamente as ligações inespecíficas.

Enzimas e Substratos

As principais enzimas utilizadas (em ordem decrescente de eficiência) são: peroxidase (peroxidase de rabanete do inglês *horseradish peroxidase*, HRP), fosfatase alcalina (AP), β -galactosidase (β -gal) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH).

Substratos cromogênicos para essas enzimas incluem: 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS); para HRP, p-nitrofenilfosfato (pNPP) para AP, orto-nitrofenil β -D-galactopiranosídeo (ONPG) e vermelho de clorofenol β -D-galactopiranosídeo (CPRG) para β -gal e NADP glicose 6-fosfato para G6PDH. Substratos quimioluminescentes também são bastante utilizados, e sua maioria, disponível no mercado, são sistemas baseados em luminol (5-amino-2,3-di-hidro-1,4-ftalazinadiona). Dentre os substratos fluorogênicos, destacam-se: ácido p-hidroxifenilacético (PHPA); ácido 3-(p-hidroxifenil) propiônico (HO-PPA) e 10-acetil-3,7-di-hidroxifenoxazina para HRP; 4-metilumbeliferil fosfato para AP; 4-metilumbeliferil- β -D-galactopiranosídeo; fluoresceína di- β -galactosídeo e 4-metilumbeliferil galactosídeo 6 sulfato para β -gal.

Incubação: Tempo e Temperatura

Os tempos de incubação e temperaturas para todos os passos devem ser determinados empiricamente. Em geral, a temperatura da incubação influencia no tempo de reação. Por exemplo, se a incubação é padronizada a 4°C, normalmente o tempo necessário será de 12 horas (*overnight*) para a obtenção do sinal desejado. Se forem realizadas incubações a 37°C, os tempos requeridos serão bem menores.

Interações Inespecíficas

Todo imunoensaio deve reagir de acordo com o esperado. Qualquer reação indesejada leva a resultados quantitativos e qualitativos incorretos. A figura 21.5 ilustra os tipos mais comuns de reações indesejadas.

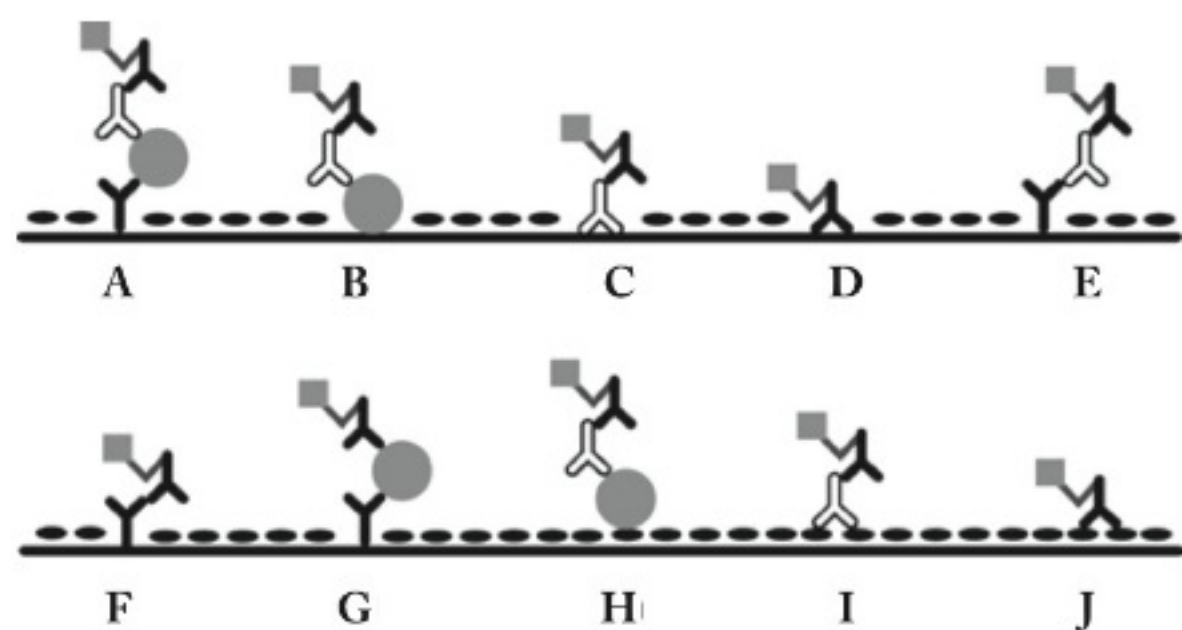


Figura 21.5 – Algumas interações inespecíficas em um imunoensaio enzimático. (A) Reação esperada; (B, C e D) adsorção direta na placa; (E e F) afinidade direta entre os anticorpos; (G) afinidade entre o anticorpo secundário e o ligante; (H, I e J) interações com o bloqueador.

Concluindo, as condições do ensaio devem ser otimizadas desde a escolha da placa, passando pelos parâmetros que afetam a cobertura e interação entre antígeno e anticorpos, até o sistema de detecção. Vários fatores afetam sensibilidade, especificidade, linearidade e reprodutibilidade do ensaio. Assim, a qualidade dos reagentes deve ser observada, como a variação entre lotes de anticorpos, por exemplo. Os interferentes presentes na amostra também devem ser considerados, para minimizar falsos-positivos ou falsos-negativos.

Materiais Necessários – ELISA de Captura

Equipamentos

- Espectrofotômetro (leitor de microplacas).
- Peagômetro.
- Pipetador multicanal para os volumes: 10, 20, 100 e 200 μ L.
- Refrigerador.
- Tubos com capacidade de 1,5 e 0,5 mL.
- Agitador magnético.
- Pipetas para os volumes: 5, 10 e 25 mL.

Reagentes

- Anticorpo de captura (IgG): anticorpo primário específico para proteína em estudo (geralmente policlonal).
- Anticorpo de detecção (IgG): anticorpo primário específico para proteína em estudo (geralmente monoclonal).

- Anticorpo secundário (anti-IgG) conjugado com peroxidase *Horseradish* (HRP).
- *Tween*[®] 207.
- Controle - antígeno para curva de calibração.
- Substrato para peroxidase: pode ser utilizado um substrato sensível como TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) ou OPD (ortofenilenediamina).
- Placa de poliestireno com 96 poços para imunoensaio (não pode ser placa para cultura de células).
- Tampão de cobertura.
- Tampão de bloqueio.
- Tampão de lavagem.
- Solução de parada (opcional): H_2SO_4 a 1 N.

Procedimento Experimental

Nota: Este é um exemplo de protocolo. A otimização das diluições para todos os anticorpos, amostras, e controles deve ser determinada empiricamente, requerendo várias titulações. Isto também é válido para o pH das soluções, concentração de detergente, tempo de incubação etc.

Preparo das Soluções – Recomendações Gerais

Para evitar variações entre resultados, utilize sempre todas as soluções à temperatura ambiente. Não diluir ou armazenar anticorpos em frascos de poliestireno.

Solução de Cobertura

Diluir o anticorpo de captura (ou cobertura) para imobilizá-lo na placa. As soluções mais utilizadas são: tampão carbonato de sódio, pH 9,6; tampão Hidroclorato de Tris (hidroximetil aminometano) (Tris-HCl), pH 8,5; PBS 10 mM, pH 7,2. A concentração da proteína varia entre 1 e 10 μ g/mL.

Solução de Bloqueio

BSA, leite desnatado, caseína etc. Cada ensaio requer um tipo diferente de bloqueador.

Solução para os Anticorpos Primário (de Detecção) e Secundário Conjugados com Enzima

Os anticorpos devem ser diluídos em tampão de bloqueio para evitar ligações inespecíficas. A concentração da proteína varia entre 0,1 e 1,0 μ g/mL.

Solução para Amostra

Utilize o mesmo tampão de bloqueio para evitar ligações inespecíficas. A concentração da proteína varia entre 0,1 e 1,0 µg/mL.

Solução de Lavagem

PBS a 0,1 M ou PBS-Tris (pH 7,4) com um detergente como *Tween*® 20 (0,02%-0,05% v/v).

Cobertura da Placa

- 1) Pipetar em cada poço 100 µL do anticorpo de captura (ou cobertura) diluído no tampão de cobertura. A diluição deve seguir a recomendação do fabricante.
- 2) Cobrir a placa e incubar por até 1-2 h à temperatura ambiente ou 4°C *overnight* (16 horas).
- 3) Esvaziar a placa por inversão, lavar com a solução de lavagem de 4 a 8 vezes.

Bloqueio da Placa

1. Pipetar 200 µL da solução de bloqueio em cada poço (não adicionar detergente nesta etapa).
2. Cobrir a placa e incubar por 1-2 h. Tempos menores podem ser testados.
3. Esvaziar a placa por inversão, lavar com a solução de lavagem de 4 a 8 vezes.

Aplicação da Amostra e Controles

1. Pipetar 100 µL da amostra ou controle em cada poço (diluir, se necessário).
2. Cobrir a placa e incubar à temperatura ambiente entre 2-4 horas ou 4°C *overnight* (16 horas).
3. Esvaziar a placa por inversão, lavar com a solução de lavagem de 4 a 8 vezes.

Incubação com o Anticorpo de Detecção

1. Diluir o anticorpo de detecção. Pipetar 100 µL do anticorpo em cada poço.
2. Cobrir a placa e incubar à temperatura ambiente por 1 hora.
3. Esvaziar a placa por inversão, lavar com a solução de lavagem de 4 a 8 vezes.

Incubação com o Anticorpo Secundário Conjugado com Enzima

1. Diluir o anticorpo secundário. Pipetar 100 µL do anticorpo em cada poço.
2. Cobrir a placa e incubar à temperatura ambiente por 30 minutos.
3. Esvaziar a placa por inversão, lavar com a solução de lavagem de 4 a 8 vezes.

Detecção com Substrato Cromogênico

1. Pipetar 100 µL do substrato cromogênico em cada poço.
2. Cobrir a placa e incubar à temperatura ambiente de 20 a 30 minutos. A reação gera uma coloração azul.
3. A reação pode ser parada com 50 µL da solução de parada (opcional), com a mudança de cor para amarelo.
4. Realizar a leitura da placa em um espectrofotômetro (leitor de ELISA) nos comprimentos de onda indicados para leitura da placa:

TMB: sem parada da reação = 620-650 nm
com parada da reação = 450 nm

Soluções e Reagentes para ELISA

Tampão de Cobertura: Tampão Carbonato, pH 9,6 (carbonato de sódio a 0,15 M, bicarbonato de sódio a 0,35 M, azida sódica a 0,03 M)

- 3,18 g de Na₂CO₃
- 5,86 g de NaHCO₃
- 0,4 g de NaN₃
- Ajustar o pH para 9,6 com HCl. Completar o volume para 200 mL com H₂O ultrapura. Filtrar (opcional).

Tampão Salina Fosfato: PBS concentrado 10×, pH 7,4 (fosfato a 0,2 M, NaCl a 1,5 M)

- 2,28 g de NaH₂PO₄: (PM=120); 0,038 M)
- ou 2,62 g de NaH₂PO₄(H₂O): (PM=137,99; 0,038 M)
- 11,5 g de Na₂HPO₄: (PM=141,96; 0,162M)
- 43,84 g de NaCl.
- pH 7,4. Completar o volume para 500 mL com H₂O ultrapura. Filtrar (opcional). Diluir 1:10 para concentração final.

Tampão de Lavagem: PBS-*Tween*[®] (PBS com 0,05 % *Tween*[®]-20, 0,02 % azida sódica)

- 400 mL de PBS concentrado 10×
- 8 mL de azida sódica a 10%.
- 2 mL de *Tween*[®]-20.
- Completar o volume para 4,0 L com água (H₂O) ultrapura. Filtrar (opcional).

Tampão de Diluição

- Utilizar o tampão de bloqueio para diluir os anticorpos, antígenos e controles.

Tampão de Bloqueio (PBS concentrado 1× com BSA a 1%, azida sódica 0,02%)

- 50 mL de PBS concentrado 10×
- 1 mL de azida sódica a 10%.
- 5 g de BSA.
- Completar o volume para 500 mL com H₂O ultrapura. Filtrar (recomendado).

Tampão para o Substrato Cromogênico: (TMB)

- 6 mg de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina).
- 10 mL de KP 1M, pH 6,5.
- 150 µL H₂O₂ a 30% (adicionar somente no momento da utilização).
- Completar o volume para 100 mL com H₂O ultrapura. Filtrar (opcional).

Azida Sódica a 10%

- 2g de azida sódica.
- Complete o volume para 20 mL com H₂O ultrapura. Filtrar (opcional).

Problemas com ELISA

Sinal Fraco ou Inexistente

- Teste um anticorpo primário com maior afinidade.
- Há algum interferente na cobertura, como alta concentração de ureia?
- Todos os principais reagentes foram adicionados?
- Houve a omissão de algum passo por engano?
- O substrato foi preparado corretamente?
- O substrato é o correto para a enzima conjugada?

- A concentração do detergente está muito alta? Remover ou diminuir o detergente do tampão de lavagem.
- Há algum inibidor da enzima? Azida sódica em quantidades elevadas pode inibir a peroxidase. Removê-la ou diminuir sua concentração.
- O substrato não está vencido?
- O tempo de incubação está apropriado? Verificar as recomendações do fabricante.
- A temperatura de incubação está adequada? Verificar se o sistema não foi superaquecido ou a temperatura ambiente é muito baixa.
- Os volumes estão corretos? Verificar as pipetas.

Ruído (*background*) muito Alto

- Possíveis ligações inespecíficas dos anticorpos. Modificar as condições de bloqueio. Diminuir as lavagens, pois pode estar ocorrendo uma variação por desnaturação.
- A placa pode não estar sendo lavada apropriadamente. Verifique se todos os poços são preenchidos a cada lavagem.
- A concentração do conjugado está muito elevada. Verificar as recomendações do fabricante.
- Considerar a ocorrência de reações cruzadas do anticorpo de detecção com o anticorpo de captura. Fazer um controle com poços com cobertura e detecção, sem adição da amostra.
- Temperatura muito alta (> 37°C) durante todo o processo.
- As albuminas podem, em certos casos, contribuir para o aumento da variabilidade, causando a desorção (separação) das proteínas já ligadas.

Desenvolvimento Inesperado de Cor na Placa

- Geralmente é resultado da lavagem incompleta. Se as amostras foram tituladas e a placa lavada manualmente, começar lavando os poços com concentração menor (mais diluídos).
- Contaminação da solução com íons metálicos ou agentes oxidantes. Verificar a qualidade da água (utilizar água destilada e desionizada).

Resultados Inesperados

- Verificar se a placa de ELISA é adequada para seu sistema (há vários tipos de plástico disponíveis).
- Verificar se todos os reagentes foram preparados e adicionados na ordem correta.

Curva de Calibração Ruim

- Problemas com a lavagem. Os poços podem não ter sido esvaziados corretamente durante o processo.
- Empilhamento das placas durante a incubação, provocando um “efeito de borda”. Mantê-las separadas.
- Erro de diluição. Verificar as pipetas e a técnica de pipetagem.
- Adsorção variável dos reagentes. Verificar o pH do tampão de cobertura, considerar a utilização de outro tipo de placa.

Referências

- Butler, J.E. The immunochemistry of sandwich ELISAs - VI. Greater than 90% of monoclonal and 75% of polyclonal anti-fluorescyl capture antibodies (CAbs) are denatured by passive adsorption. *Mol. Immunol.*, 30(13):165-1175, 1993.
- Butler, J.E. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Immunoassay*, 21(2-3):165-209, 2000.
- Cantarero, L.A.; Butler, J.E.; Osborne, J.W. The adsorptive characteristics of proteins for polystyrene and their significance in solid-phase immunoassays. *Anal. Biochem.*, 105: 375-382, 1980.
- Corning Incorporated (Life Sciences). Effective Blocking Procedures (ELISA Technical Bulletin No. 3). Disponível em http://www.corning.com/lifesciences/technical_information/techdocs/elisa3.pdf. Acessado em 02/07/2002.
- Corning Incorporated (Life Sciences). Optimizing the Immobilization of Protein and Other Biomolecules (ELISA Technical Bulletin No.2). Disponível em: http://www.corning.com/lifesciences/technical_information/techdocs/elisa2.pdf. Acessado em 09/08/2002.
- Crowther, J.R. ELISA: theory and practice. *Methods in Molecular Biology*. Totowa: Humana Press, v42, 1995. 256p.
- Deshpande, S.S. Enzyme Immunoassays: from concept to product development. New York: Chapman & Hall, 1996. 464 p.
- Esser, P. Blocking Agent and Detergent in ELISA NUNC Bulletin no. 9. Disponível em <http://www.nuncbrand.com/docs/doc_Bulletin_9.asp. Acessado em 11/03/2002.
- Esser, P. Principles in adsorption to polystyrene. NUNC Bulletin no. 6. Disponível em: http://www.nuncbrand.com/docs/doc_Bulletin_6-1.asp. Acessado em 08/09/2002.
- Murray, A.M.; Kelly, C.D.; Nussey, S.S.; Johnstone, A.P. Production of glutathione-coated microtitre plates for capturing recombinant glutathione S-transferase fusion proteins as antigens in immunoassays. *J. Immunol. Methods*, 218: 133-139, 1998.
- Pierce Biotechnology. Assay Development and Enzyme Substrates. Disponível em: <http://www.piercenet.com/products/browse.cfm?fldID=0104>. Acessado em 17/12/2002.
- Pierce Biotechnology. Immunoassay. Disponível em: <http://www.piercenet.com/resources/browse.cfm?fldID=353>. Acessado em 27/12/2002.
- Selby, C. Interference in immunoassay. *Ann. Clin. Biochem.*, 36 (part 6): 704-721, 1999.
- Stevens, P.W.; Hansberry, M.R.; Kelso, D.M. Assesment of adsorption and adhesion of proteins to polystyrene microwells by sequential enzyme-linked immunosorbent assay analysis. *Anal. Biochem.*, 225:197-205, 1995.
- Tecan Group. Fluorescence ELISA – a comparison between two fluorogenic and one chromogenic enzyme substrate. Disponível em: http://www.tecan.com/dna_quant1-2.pdf. Acessado em 14/01/2003.
- Wild, D. (ed.). The Immunoassay Handbook. 2nd ed. New York: Nature Publishing Group, 2001. 906p.

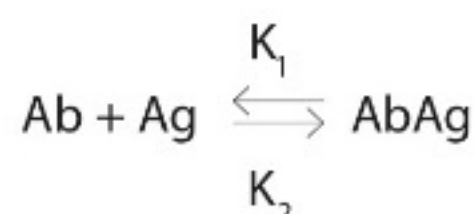
22. Identificação de Proteínas por Imunoprecipitação

Patrícia Gama
Estela Bevilacqua
Rui Curi

Introdução

O método de imunoprecipitação é largamente empregado na identificação da massa molecular de antígenos, avaliação da associação entre proteínas e caracterização da especificidade de anticorpos. Este método precede outras técnicas de estudo de proteínas, tais como *Western blotting*, ELISA, radioimunoensaios, entre outras.

O método de imunoprecipitação fundamenta-se na reação antígeno-anticorpo, que pode ser tratada sob as bases da regra da ação das massas: a combinação do anticorpo (Ab) e antígeno (Ag), sendo considerada uma reação biomolecular reversível.



Onde k_1 e k_2 representam a taxa constante da reversibilidade da reação.

$$\frac{(\text{AbAg})}{(\text{Ab}) \times (\text{Ag})} = \frac{k_1}{k_2} = K$$

Onde (Ab), (Ag) e (AbAg) representam a concentração dos reagentes e do produto e K é a constante de equilíbrio e associação. A determinação do valor de K para uma reação antígeno-anticorpo particular é necessária para a determinação da constante termodinâmica. Os dados termodinâmicos indicam a natureza das ligações estabelecidas entre os dois reagentes.

A formação do imunoprecipitado apresenta uma relação entre a concentração do antígeno e a do anticorpo. Conforme pode-se observar na figura 22.1, mantendo fixa a concentração do anticorpo e adicionando quantidades crescentes de antígeno, tem-se um aumento na quantidade do complexo precipitado. Esta região de aumento do complexo precipitado é denominada de intervalo ou

zona de excesso de anticorpo (região A). Acima deste ponto não haverá aumento no complexo precipitado devido ao grau de equivalência formado entre o anticorpo e o antígeno, chamado de zona de equivalência (região B). Aumentando a quantidade de antígeno, atinge-se a chamada zona de inibição (excesso de antígeno); a partir deste ponto há diminuição progressiva na quantidade do complexo antígeno-anticorpo formado (região C).

Materiais Necessários

Reagentes

- Ácido fosfórico.
- Anticorpo primário específico para proteína em estudo.
- Benzamidina.
- Cloreto de potássio.
- Ditioneitol (DTT).
- Fluoreto de sódio.
- Fosfato de sódio.
- Fosfato de potássio monobásico.
- Fosfato de potássio dibásico.
- Gelo.
- Glicerol.
- Inibidores de protease e fosfatase (ortovanadato de sódio, fluoreto de fenilmetilsufonila (PMSF), fluoreto de sódio, aprotinina, benzamidina e leupeptina).
- Pirofosfato de sódio.
- Proteína A sefarose.
- Triton X-100.

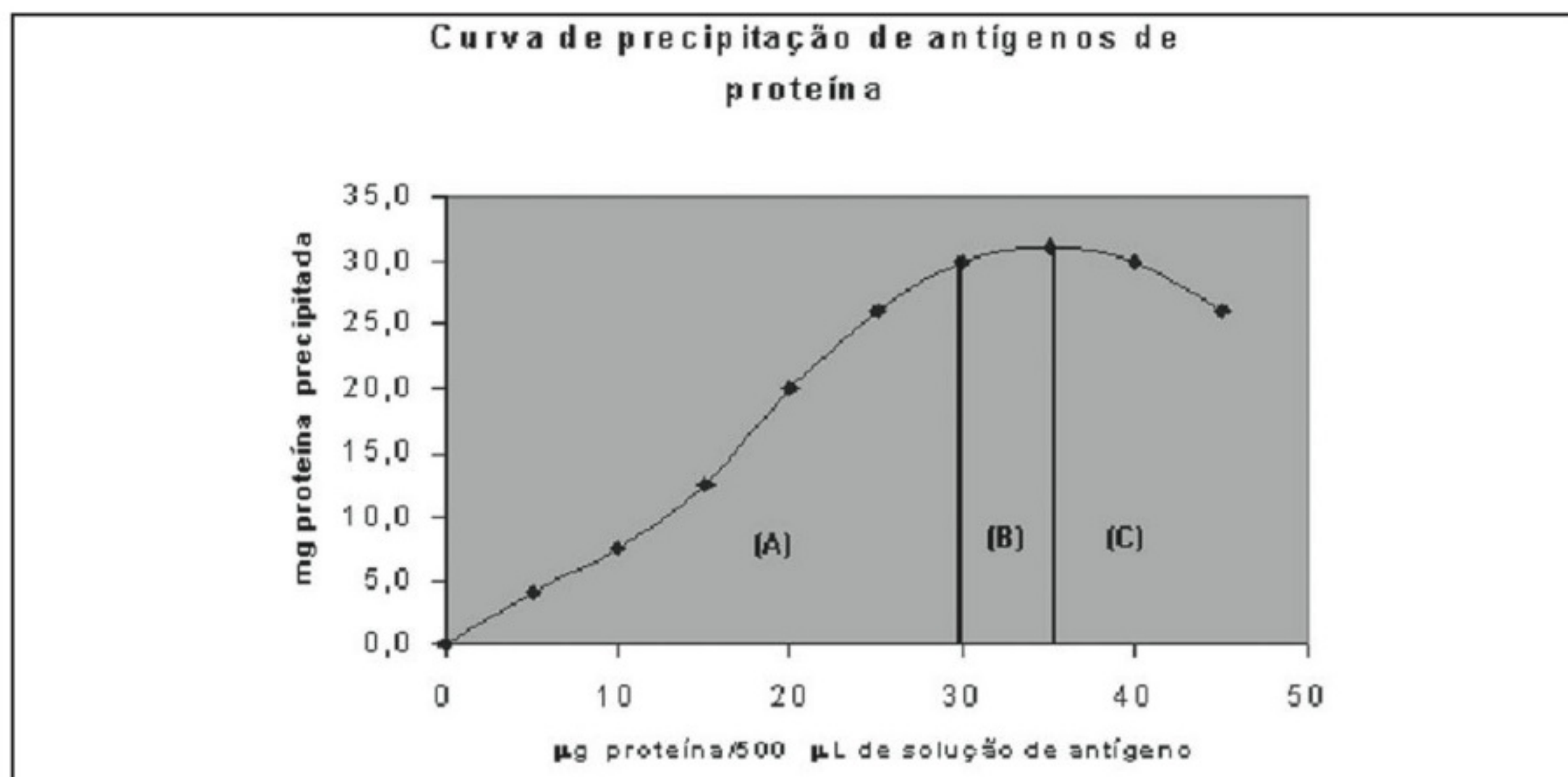


Figura 22.1 – Curva de precipitação da IgG-globulina com o anticorpo específico correspondente. A) Representa o intervalo ou zona de excesso de anticorpo, onde se observa uma relação direta entre a concentração de anticorpo e a de antígeno e o precipitado formado. B) Ponto de estabilização na formação do precipitado, em decorrência da equivalência formada entre o anticorpo e o antígeno. C) Ponto de inflexão da curva, resultante do excesso de antígeno, com a inibição na formação do complexo de precipitado.

De modo geral, o Tampão fosfato salina (PBS) é utilizada para o preparo de outros reagentes empregados na reação.

Tampão fosfato salina (PBS)	136 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 0,9 mM de KH_2PO_4 e 6,4 mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; ajustar pH para 7,5
-----------------------------	---

Na figura 22.2 tem-se o fluxograma representativo das etapas envolvidas no método de imunoprecipitação.

Método

Preparação da Amostra e Extração de Proteína

Para Células em Suspensão

1. Retirar uma alíquota e avaliar o número de células utilizando uma câmara de Neubauer, ajustando para uma concentração final de 8×10^7 células.
2. Centrifugar a suspensão a $14.000 \times g$ durante 20 minutos a 4°C .
3. Colocar os tubos previamente centrifugados em gelo e adicionar ao sedimento 800 µL do tampão de extração gelado.

Para Células Aderidas em Substrato

1. Colocar as placas sobre gelo, retirar o meio de cultura, lavar com PBS e colocar 100 µL (para placa

P100) de tampão de extração gelado. Com um *poli-ceman* raspar a placa e incliná-la um pouco para aspirar o conteúdo e transferi-lo para um microtubo.

2. Centrifugar a $12.000 \times g$ durante 5 minutos a 4°C , retirar o sobrenadante. A amostra pode ser mantida a -80°C até ser utilizada.

Para Tecidos

- 1) Após a coleta, o tecido deve ser colocado imediatamente em tampão TBS 20 mM (pH 7,4) com PMSF 10 mM (8,5g de NaCl, 2,42 g Tris; água – quantidade suficiente para 1 litro; acrescentar o PMSF da solução estoque a 100mM preparada em etanol absoluto mantido a 4°C).
- 2) Proceder à extração de proteína total utilizando o tampão de lise adequado para o tecido (exemplo: RIPA: NaCl 150 mM; ácido deoxicolato de sódio a 0,1%, Tris- HCl a 50mM (pH 7,5); NP-40 a 1% e a água – quantidade suficiente para 20 mL).
- 3) Centrifugar a $12.000 \times g$ durante 5 minutos a 4°C , retirar o sobrenadante. A amostra pode ser mantida a -80°C até ser utilizada.

Na tabela 22.1 observa-se um exemplo de solução de extração de proteínas.

Nota: Para alguns tipos celulares e alguns tecidos, pode ser necessário sonicar as amostras.

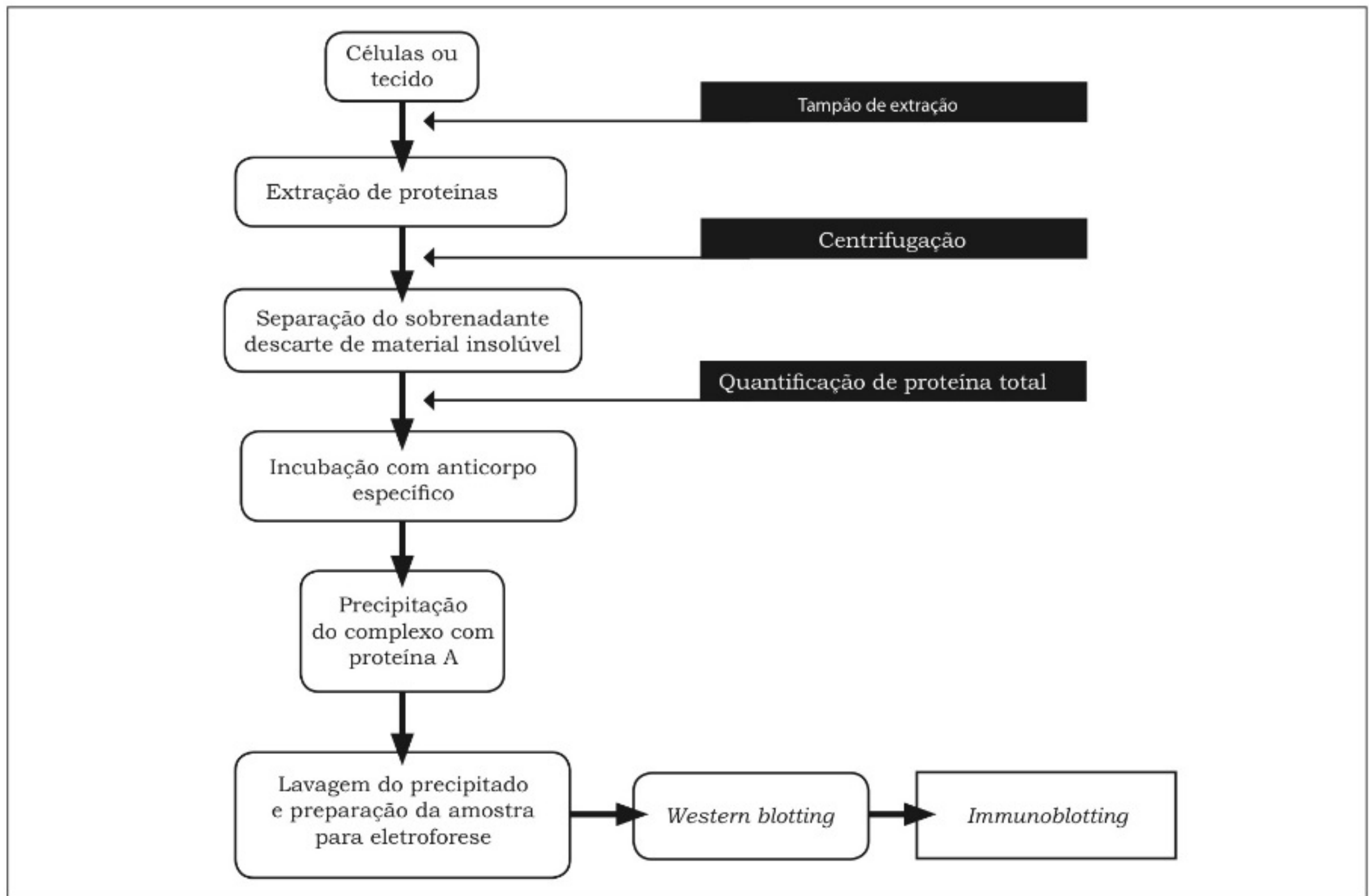


Figura 22.2 – Fluxograma representativo das etapas envolvidas na realização do método de imunoprecipitação.

Tabela 22.1 – Solução de extração de proteína para tecidos.

Soluções	Preparo	Observações
Solução tampão de extração*, para imunoprecipitação	100 mM de Tris, 10 mM de EDTA, 100 mM de pirofosfato de sódio, 1% de Triton X-100. No momento do uso, acrescentar os inibidores de proteases (100 mM de fluoreto de sódio, 2 mM de PMSF, 1 mM de aprotinina, 1 mM de leupeptina, 0,45 mM de benzamida) e inibidor de fosfatase (10 mM de ortovanadato de sódio– Na_3VO_4). Triton X-100 deve ser acrescentado após homogeneização	Esta solução deve ser mantida a 4 °C. Nesta etapa é indispensável utilizar os inibidores de proteases (aprotinina, benzamida, leupeptina, pepstatina e fluoreto de fenilmetilsulfonila –PMSF, ou um coquetel pronto), um quelante de cálcio para inibir a ação de proteases dependente de cálcio (EDTA) e um tampão para manter o pH fisiológico (Tris). Dessa forma, as interações proteínas-proteínas são preservadas, permitindo a caracterização das associações entre as proteínas, após a separação eletroforética. Esta etapa do procedimento deve ser realizada em gelo

* O tampão de extração pode variar dependendo do tipo de amostra utilizada. Procure sempre checar a literatura antes de iniciar a técnica.

Obs.: 1) A adição de Triton × 100 pode dificultar a quantificação proteica, certifique-se se para a sua amostra é realmente necessário utilizá-lo.
2) Todos os inibidores de proteases e fosfatase devem ser adicionados no momento de utilização.

Determinação da Concentração de Proteína Total

A proteína total solúvel é quantificada por meio da técnica clássica descrita por Bradford (1976); (para detalhes, ver Cap. 20). Após a obtenção da concentração de proteínas nos diferentes tubos, estas devem ser ajustadas para um único valor antes de seguir com o experimento. Este método pode ser facilmente montado no laboratório ou adquirido sob a forma de *kit* comercial.

Incubação com o Anticorpo Primário

Incubar 50-100 µg de proteína com 1-2 µL de anticorpo durante a noite toda a 4°C.

Nota: O anticorpo primário empregado sempre deverá apresentar especificidade ao antígeno investigado, podendo ser constituído de imunoglobulinas purificadas ou não.

Precipitação do Anticorpo com Proteína A

1. Acrescentar a solução proteína A Shepharose em PBS (200 µL/mg de proteína).
2. Homogeneizar suavemente.
3. Incubar durante 90-120 minutos a 4°C sob agitação suave.

Remoção do Complexo Antígeno-anticorpo a partir da Proteína A/G

1. Centrifugar a 5.000 rpm durante 5 minutos a 4°C.
2. Remover o sobrenadante.
3. Acrescentar 1 mL da solução de lavagem.
4. Centrifugar 5.000 rpm durante 5 minutos a 4°C.
5. Repetir os passos 2 e 3 mais duas vezes.
6. Fazer uma última lavagem em PBS, repetir o passo 3.

Obs. 1: Nas etapas de lavagem, removem-se as proteínas que não fazem parte do imunocomplexo. Pode-se empregar uma solução para manter a estabilidade das proteínas acrescida de detergente em uma concentração menor do que a empregada no processo de lise das células e quelantes como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Contudo, se o imunoprecipitado resultante tiver muitas proteínas, recomenda-se acrescentar cloreto de sódio (NaCl) em concentrações elevadas (0,5 M), possibilitando separar as ligações inespecíficas, formadas entre os anticorpos.

Obs. 2: O NaCl é usado em vez do KCl devido ao fato de que o cloreto de potássio precipita em SDS, dificultando a resolução em géis de SDS.

Na tabela 22.2 tem-se as informações sobre o preparo da Solução de Proteína A Shepharose em PBS utilizada na remoção do complexo antígeno-anticorpo a partir da proteína A/G.

Preparação da Amostra para Análise em Western Blotting

1. Desprezar o sobrenadante, deixando somente o sedimento.
2. Acrescentar em torno de 20 µL do tampão de Laemmli contendo DTT (100 mM).
3. Ferver as amostras por 3 a 5 minutos.
4. Centrifugar rapidamente à temperatura ambiente.
5. O sobrenadante, que contém a proteína de interesse, deve ser transferido para o gel SDS-PAGE a 12%.
6. O processo seguinte deve ser feito conforme descrito no capítulo Identificação de Proteínas por *Western Blotting*.

Tabela 22.2 – Preparo da Solução Proteína A Sepharose em PBS.

Solução	Preparo	Observação
Solução de proteína A Sepharose em PBS.	A proteína A é obtida comercialmente. Deve ser preparada conforme as instruções, antes de se iniciar o procedimento de imunoprecipitação. Sempre agitar suavemente no momento do uso para evitar precipitação da proteína.	A proteína A ligada a Sepharose é utilizada para precipitar o imunocomplexo, constituído pela ligação da proteína ao anticorpo primário. Outro reagente que pode substituir a proteína A é a proteína G ou sulfato de amônio (saturação de 40%). A proteína A é isolada de <i>Staphylococcus aureus</i> , ligando inespecificamente ao anticorpo. No caso de anticorpos monoclonais recomenda-se o uso da proteína G, a qual apresenta maior eficiência de afinidade.

Exemplificação de Resultado

Foi realizada imunoprecipitação com anticiclina E (Cdk2) e *immunoblotting* com anticorpo para Cdk2.

A presença da banda indica o complexo entre as duas proteínas. Como controle, é possível realizar um *immunoblotting* para a ciclina E, confirmando sua imunoprecipitação (Fig. 22.3).

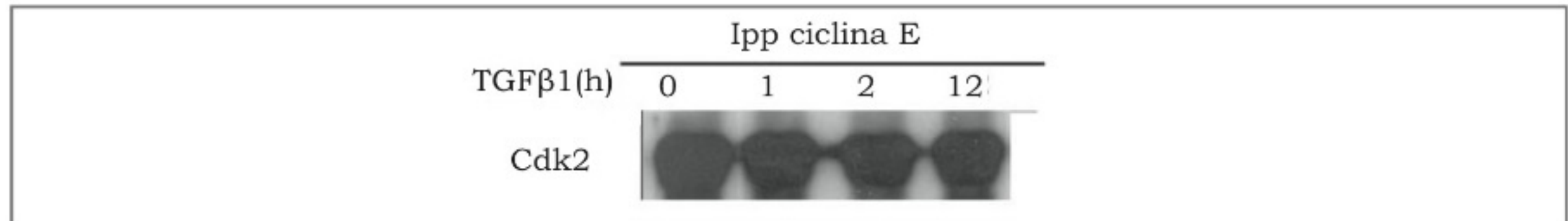


Figura 22.3 – Detecção do complexo ciclina E-Cdk2 por meio de imunoprecipitação de ciclina E e *immunoblotting* para Cdk2 em amostras de mucosa gástrica de ratos sob tratamento com TGFβ1. Foi utilizado SDS-PAGE a 12% e revelação com *kit* ECL em filme de raios X. (Cortesia de Eunice Ribeiro de Andrade Sá e Patrícia Gama.)

Referências

- Analysis of proteins. In: Ausubel, F.M, Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., eds., In: *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Greene, Wiley, 1988. cap. 10.
- Bradford, D.M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254, 1976.
- Clausen, J. *Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules*. Amsterdam: North-Holland, 1977.
- Golub, E. S. The immune response: an overview. In: *Methods in cell biology*. Asai, D. J. ed. San Diego: Academic Press, 1993. p. 1-5 (Antibodies in cell biology, v. 37 Cap. 1).
- Laemmli, V.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-686, 1970.
- Lidell, E.; Weeks, I. *Antibody technology*. Oxford: Bios Scientific Publishes, 1995. 146.
- Otto, J.J.; Lee, S.-W. Immunoprecipitation methods. In: *Methods in cell biology*. Asai, D. J. ed. San Diego: Academic Press, 1993. p. 119-127 (Antibodies in cell biology, v. 37 Cap. 7).

23. Identificação de Proteínas por *Western Blotting*

Luciana Chagas Caperuto
José Edgar Nicoletti Carvalho
Rozângela Verlengia
Rui Curi

Introdução

Em 1975, o pesquisador Southern realizou o primeiro *blotting*, transferindo DNA contido em gel de agarose para uma membrana de nitrocelulose. *Blotting* é uma palavra de origem inglesa que significa manchar e essa técnica foi chamada de *Southern blotting*. Subsequentemente, foram desenvolvidas técnicas de transferência de RNA e proteínas contidos em gel para uma membrana que, por analogia de nomenclatura, foram denominadas, respectivamente, de *Northern blotting* e *Western blotting*.

O *Western blotting* (também conhecido como *immunoblotting*) foi desenvolvido a partir de metodologias em que anticorpos eram utilizados para determinação qualitativa direta de proteínas contidas nos géis de poliacrilamida (Burrige, 1976; Showe et al., 1976). O trabalho de Burrige, em 1976, é o primeiro exemplo da combinação do uso de um gel de poliacrilamida e Sulfato de Sódio Dodecila (SDS). Esse tipo de técnica de separação de proteínas teve sucesso devido à facilidade do manuseio, com localização direta do antígeno no gel, e também pela excelente resolução apresentada na avaliação das proteínas separadas. Posteriormente, o *immunoblotting* evoluiu para uma técnica mais versátil, na qual os polipeptídeos separados são transferidos para um suporte sólido, como, por exemplo, membrana de nitrocelulose, folhas de náilon ou de acetato de celulose, sendo a membrana de nitrocelulose o suporte sólido mais empregado (Towbin et al., 1979; Burnette, 1981). A técnica de *Western blotting* possibilita identificar proteínas em uma mistura complexa, na qual podem ser determinados as quantidades e os tamanhos de proteínas específicas. Além disso, pela mesma técnica, pode-se avaliar modificações covalentes de uma proteína, como, por exemplo, a ocorrência de fosforilações em determinados resíduos aminoácidos de sua molécula.

As proteínas a serem identificadas podem ser extraídas tanto de células (cultura primária ou permanente) quanto de tecidos, utilizando-se tampão de extração e metodologias de homogeneização adequadas. São, então, inseridas em um gel de poliacrilamida nativo, no qual são separadas eletroforicamente quando submetidas a uma diferença de potencial (ddp) gerada por um campo elétrico – já que constituem partículas eletricamente carregadas. As proteínas devem estar em uma solução cujo pH seja diferente de seu ponto isoeletrico – pH no qual a proteína apresenta carga nula. Desse modo, ocorre separação dos componentes (mistura proteica) por eletroforese. Essa migração depende da relação de carga e massa da proteína.

No entanto, a separação eletroforética mais utilizada ocorre em gel de poliacrilamida desnaturante, contendo o detergente Sulfato de Sódio Dodecila (SDS). Essa técnica é conhecida como PAGE-SDS, no qual o SDS se liga a radicais hidrofóbicos das proteínas, causando sua desnaturação e conferindo-lhe carga negativa, mascarando a carga intrínseca da molécula. O complexo formado tem cargas negativas proporcionais ao comprimento das proteínas, as quais, quando submetidas à ddp, são separadas de acordo com seus pesos moleculares. Se a proteína, por exemplo, apresentar estrutura quaternária, suas subunidades serão desnaturadas, dissociadas por SDS, sendo assim possível analisar o peso molecular de cada uma dessas subunidades quando submetidas à eletroforese.

Na maioria dos casos, a eletroforese de gel SDS-poliacrilamida é realizada com um sistema tampão descontínuo, no qual, o tampão da cuba de eletroforese tem pH e força iônica diferentes do tampão utilizado no preparo do gel. A capacidade de separação das proteínas no gel de poliacrilamida depende das concentrações de acrilamida e bisacrilamida. Assim, o tamanho dos poros formados no gel é uma combinação da concentração de reagentes. Para mais detalhes, ver o Capítulo 5.

Após a separação, as proteínas são transferidas eletroforéticamente do gel para um suporte sólido, como membrana de nitrocelulose, náilon ou PVDF (difluoreto de polivinilideno), nos quais ficam imobilizadas. A seguir, a identificação imunológica das frações separadas e transferidas é feita por incubação da membrana em solução contendo os anticorpos monoclonais ou policlonais específicos para as frações. Esses anticorpos ligam-se especificamente aos epítopos antigênicos expostos pela proteína de interesse ligada à membrana. Com o uso de marcadores de peso molecular conhecido, é possível estimar o peso molecular do polipeptídeo estudado.

A detecção do antígeno depende primariamente da disponibilidade de anticorpos específicos que irão se ligar aos antígenos desnaturados e imobilizados na membrana. Esses anticorpos são comumente adquiridos de empresas especializadas. Em casos especiais, podem ser obtidos em laboratório, por meio da imunização de cobaias adequadas para este fim, com posterior purificação do anticorpo sérico. Os anticorpos utilizados podem ser radiomarcados, ligados à enzima ou, marcados por fluorescência.

A detecção pode ser feita por meio do sinal obtido pelo próprio anticorpo marcado – método direto – ou por meio de um segundo anticorpo marcado, chamado de método indireto, que apresenta maior sensibilidade, sendo assim, mais comumente empregado.

Os anticorpos empregados na detecção indireta são marcados por meio da adição de um isótopo radiativo (comumente ^{125}I), ou por meio do acoplamento de uma enzima, tal como *horseradish peroxidase* (HRP), fosfatase alcalina ou α -galactosidase, cuja detecção ocorre pela formação de uma reação colorida (sistema cromógeno) ou pela emissão de luz (sistemas quimioluminescentes). Ultimamente, o método da quimioluminescência tem sido muito utilizado por ser mais sensível que os métodos que utilizam cromógenos ou radioisótopos. A chave deste método é a utilização do anticorpo secundário conjugado à peroxidase (HRP) que, na presença de peróxido de hidrogênio, catalisa a oxidação do luminol, resultando na emissão de luz que pode ser detectada com a exposição a um filme de raio-X (Fig. 23.1).

A figura 23.2 apresenta um fluxograma representativo de todo o processo, desde a homogeneização da amostra até o procedimento de revelação do resultado final.

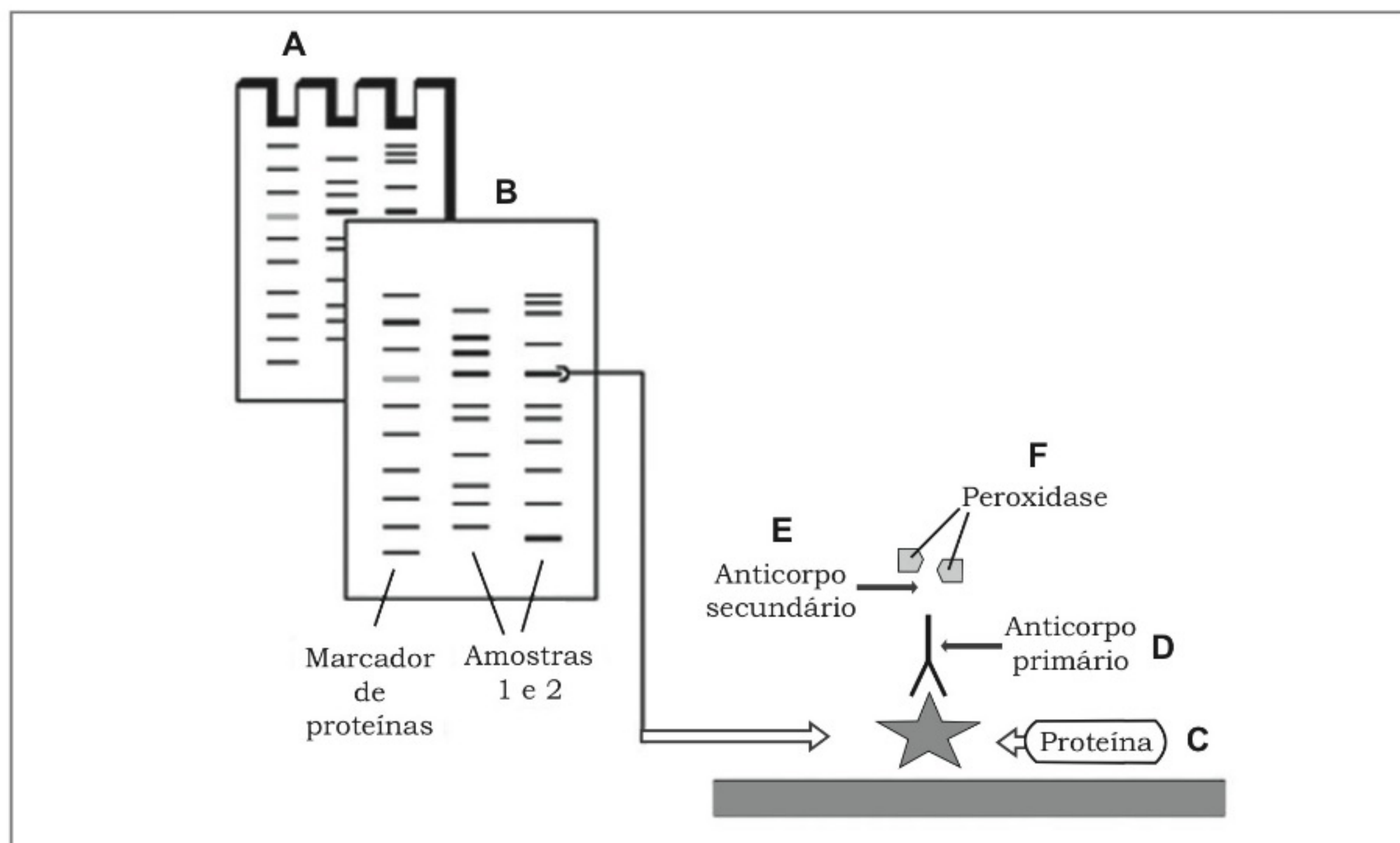


Figura 23.1 – Representação esquemática do sistema de imunodeteção indireta. (A) Separação eletroforética das proteínas; (B) perfil das proteínas após transferência para membrana; (C) proteína de interesse; (D) anticorpo primário ligado especificamente à proteína de interesse; (E) anticorpo secundário, o qual tem especificidade contra anticorpo primário utilizado no reconhecimento da proteína (imunoglobulina específica antiespécie); (F) molécula de peroxidase conjugada ao anticorpo secundário utilizada no sistema de revelação enzimático.

Western blotting é, portanto, extremamente útil para identificar e quantificar proteínas específicas a partir de uma mistura complexa. Como a separação destas proteínas é quase sempre realizada em condições desnaturantes, qualquer problema de solubilização, agregação e coprecipitação da proteína de interesse com outras proteínas é eliminado.

Materiais Necessários

Equipamentos e Acessórios

- Agitador de bancada (tipo orbital ou gangorra).
- Agitador magnético.
- Centrífuga refrigerada.
- Chassis radiográficos para exposição de filme de raio X.
- Cuba de eletroforese vertical.
- Cuba de transferência por imersão ou *semi-dry*.
- Espaçadores de 1,5 mm.
- Espectrofotômetro.
- Esponjas.
- Filme de raio X.
- Fonte de eletroforese.
- Homogeneizador de tecidos tipo Polytron ou sonificador (para células).
- Luvas de procedimentos descartáveis.
- Membrana de nitrocelulose ou PVDF.
- pHmetro.
- Papel de filtro (Whatman 3 MM) ou equivalente.
- Pentes para moldagem de poços no gel.
- Placas de vidro.
- Pipetas automáticas (0,5 -10 mL, 2 - 20 mL, 10 -100 mL, 100 - 1000 mL).
- Ponteiras para pipetas automáticas.
- Recipiente para bloqueio da membrana e incubação com o anticorpo.

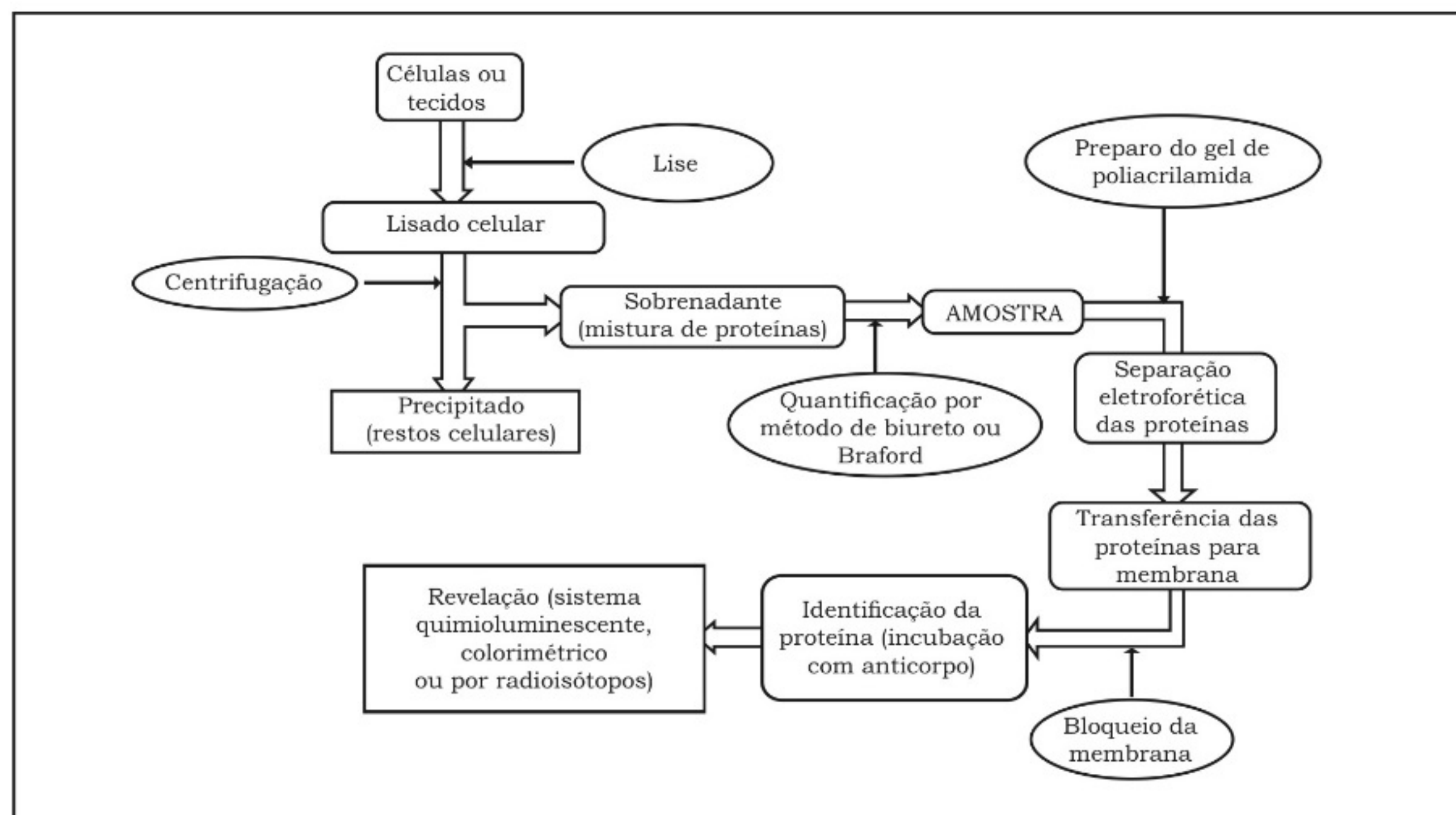


Figura 23.2 – Fluxograma representativo das etapas a serem desenvolvidas durante a execução da técnica de *Western blotting*. As células ou os tecidos devem ser lisados e a solução de proteínas deve ser quantificada e aplicada em quantidades iguais para cada amostra no gel de poliacrilamida. Submete-se o sistema a um campo elétrico, promovendo a separação eletroforética das proteínas que migram em direção ao polo positivo (ânodo). Em sequência, as proteínas separadas são transferidas para a membrana, incubadas com anticorpos específicos para a identificação do perfil proteico por sistema quimioluminescente colorimétrico ou por radioisótopos.

- Refrigerador.
- Tubos com capacidade de 1,5 e 0,5 mL.

Reagentes

- Ácido acético – PA.
- Ácido clorídrico – PA.
- Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA).
- Ácido *p*-cumárico.
- Álcool isobutílico.
- Álcool metílico.
- Anticorpo primário específico para proteína de interesse.
- Anticorpo secundário conjugado com peroxidase (HRP).
- Azida sódica.
- Cloreto de sódio.
- Corante azul de bromofenol.
- Dimetilsulfóxido (DMSO).
- Ditioneitol (DTT).
- Sulfato de sódico de duodecila (SDS).
- Fluoreto de sódio.
- Glicina.
- Hidróxido de sódio.
- Leite em pó desnatado e/ou albumina sérica bovina (BSA).
- Luminol.
- Ortovanadato de sódio.
- Padrão de peso molecular de proteína pré-corado.
- Peróxido de hidrogênio.
- Persulfato de amônio (APS).
- Pirofosfato de sódio tetraidratado.
- N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED).
- Reagente de Biureto ou Reagente de Bradford.
- Reagente Ponceau.
- Solução reveladora para filme de raio X.
- Solução fixadora para filme de raio X.

- Tris-hidroxiamino metano (Tris-base).
- Tween 20.

Procedimentos para Realização do *Western Blotting*

Resumidamente, o *Western blotting* pode ser dividido em 5 passos:

1. Preparação da amostra.
2. Separação dos polipeptídeos da amostra por eletroforese em gel.
3. Transferência dos polipeptídeos separados do gel para a membrana.
4. Verificação da eficiência da transferência (opcional) e bloqueio da membrana.
5. Detecção do antígeno.

Preparação da Amostra

Para a extração das proteínas celulares solúveis, as amostras devem ser homogeneizadas em tampão de extrato total (Tabela 23.1). A este tampão deve ser acrescentado o inibidor de fosfatases (ortovanadato de sódio), imediatamente antes do início do experimento. Para uma amostra de 100 mg de tecido, pode-se colocar aproximadamente 1 mL de tampão de extração e a homogeneização deve ser feita em um homogeneizador de tecidos tipo *Polytron*. Já para extração de proteínas de células em cultura, deve-se removê-las do recipiente de cultura para tubos de microcentrífuga e submetê-las à centrifugação (10 min, 150 g, 4°C) para a retirada do sobrenadante. Após isto, deve ser acrescentado 1 mL de solução isotônica (PBS, por exemplo) e submeter as células novamente à centrifugação (10 min, 150 g, 4°C) para a retirada do sobrenadante. Deve-se, então, acrescentar uma quantidade de tampão de extração que seja equivalente a aproximadamente o dobro do volume de precipitado celular formado. A homogeneização das células deve ser realizada em sonificador.

Além das amostras de lisados celulares ou teciduais, outras amostras comumente utilizadas incluem amostras parciais ou totalmente purificadas ou amostras imunoprecipitadas. Para mais detalhes sobre imunoprecipitação, consultar o capítulo 22.

Extração das Proteínas

1. A amostra deve ser diluída em tampão de extrato total previamente aquecida em banho-maria a aproximadamente a 100°C e imediatamente homoge-

neizada. Após a homogeneização, a amostra, tanto extraída de tecidos como de cultura de células, deve ser mantida em água fervente por aproximadamente 10 minutos para desnaturação proteica.

2. A amostra deve ser transferida para um tubo de microcentrífuga (1,5 mL) e submetida à centrifugação durante 40 minutos a 15.000 g, a 4°C. Retira-se o sobrenadante desprezando o precipitado (constituído de restos celulares).
3. Deve-se determinar a concentração de proteínas totais do sobrenadante de cada amostra para fins de normalização do conteúdo proteico na aplicação do gel. Este procedimento deve ser adotado quando o objetivo do *Western blotting* é a comparação da expressão ou quantidade de fosforilação de determinada proteína entre as amostras. A determinação das proteínas totais pode ser realizada pelo método de biureto ou Bradford. Para mais detalhes sobre a quantificação das proteínas, ver capítulos 19 e 20.
4. Após a determinação da concentração proteica, o sobrenadante deve ser misturado com o tampão de amostra ou de Laemmli, na proporção de 1:5 (v/v). Por exemplo, deve-se acrescentar 50 mL de tampão de Laemmli em 200 mL de sobrenadante.

Separação dos Polipeptídeos da Amostra por Eletroforese em Gel

1. Primeiramente, deve-se montar adequadamente os vidros com os espaçadores para a confecção do gel, de acordo com as instruções do fabricante do equipamento empregado. De modo geral, a estrutura do sistema já montado pode ser observada na figura 23.3. Haverá um espaço entre os vidros formados com o auxílio dos espaçadores, que poderão vir separadamente ou inseridos na superfície lateral dos vidros. Esse espaço geralmente é de 0,75 a 1,5 mm, refletindo a espessura do gel.

Para verificar a existência de possíveis vazamentos, pode ser feito um teste colocando-se água ultrapura no espaço entre os vidros após a montagem do sistema.

2. Preparar, sempre utilizando luvas, o gel de separação com concentrações de acrilamida e bisacrilamida ideais para a separação eletroforética adequada do polipeptídeo de interesse (ver Tabelas 5.4 e 5.5, Capítulo 5, com as receitas para os géis de separação). A adição do TEMED e do APS (Tabela 23.2) deve ser feita por último. O TEMED induz a formação do radical livre do APS. Esse, por sua vez, catalisa a

formação de radicais livres na acrilamida e bisacrilamida iniciando a polimerização do gel. Colocar o gel ainda (não polimerizado) no espaço formado pelos dois vidros, deixando espaço suficiente para o gel de empilhamento e encaixe dos pentes (procedimento que será realizado posteriormente).

3. Aguardar a polimerização (cerca de 10 min). O contato do oxigênio do ar com a solução dificulta a polimerização do gel, sendo que, dessa maneira, a concentração de APS recomendada é superior à necessária.
4. Separadamente, preparar um outro gel, chamado de gel de empilhamento, 5% (ver Tabela 5.6, Capítulo 5). Colocar sobre o gel anterior, que já está polimerizado. Encaixar o pente com cuidado para não formar bolhas de ar em torno de sua superfície e aguardar a polimerização (cerca de 10 min). Depois da polimerização, retirar os pentes do gel de empilhamento e lavar (com água ultrapura ou tampão para eletroforese) os poços formados, cuidadosamente, com o auxílio de uma seringa, para a retirada de acrilamida e bisacrilamida não polimerizada. Colocar os vidros contendo os géis na cuba de eletroforese e acrescentar o tampão para eletroforese em gel de poliacrilamida (Tabela 23.2) com volume suficiente para envolver os vidros contendo os géis, conforme instruções do fabricante do equipamento.
5. Imediatamente antes de aplicar as amostras, aquecê-las por 5 minutos a 100°C, para a desnaturação das proteínas.
6. Aplicar de 60-150 µg de amostra nos poços formados no gel de empilhamento. A quantidade de proteína a ser aplicada deverá ser adequada conforme a expressão celular da proteína de interesse, se esta informação for conhecida. Por exemplo, se a quantidade relativa da proteína na célula é pequena, a quantidade de proteína aplicada deverá ser maior, ao redor de 100 µg. Sempre aplicar no gel as amostras com seus controles e o marcador-padrão pré-corado de peso molecular. Se necessário, pode ser aplicado no gel também um controle negativo, ou seja, uma amostra proteica que sabidamente não contenha a proteína de interesse ou, então, um controle positivo (amostra contendo a proteína de interesse).
7. Submeter o sistema a uma ddp de no máximo 30 V, até que as amostras penetrem o gel de separação. Mudar a

Tabela 23.1 – Preparo das soluções gerais.

Soluções	Preparo	Observações/Utilizações
Tampão de extrato total	<p>Preparar solução: 1% (g/mL) de SDS, 100 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA, 100 mM de pirofosfato de sódio tetra-hidratado, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de ortovanadato de sódio</p> <p>Para o preparo de 50 mL do tampão de extrato total, deve-se adicionar:</p> <ul style="list-style-type: none"> – 5 mL de Tris-HCl a 1 M (pH 7,5), – 2,5 mL de EDTA a 0,2 M (pH 7,0) – 5 mL de SDS a 10% (g/mL) – 0,21 g de fluoreto de sódio – 0,225 g de pirofosfato de sódio – 0,0945 g de ortovanadato de sódio – completar o volume com água ultrapura para 50 mL 	<p>Armazenar à temperatura ambiente. Propicia o rompimento das membranas celulares, possibilitando a solubilização das proteínas celulares. Preparar o tampão utilizando luvas, já que o fluoreto e o pirofosfato de sódio são tóxicos</p> <p>O inibidor de fosfatase (ortovanadato de sódio) deve ser adicionado imediatamente antes do início do experimento</p>
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O a 0,5 M (pH 7,0)	Dissolver 8,95 g de Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O em 40 mL de água ultrapura. Ajustar o pH para 7,0 e completar o volume para 50 mL com água ultrapura	Armazenar de 4 a 20°C
Tampão de amostra concentrado 5× (tampão de Laemmli modificado)	<p>Preparar solução: 0,1% (g/mL) de azul de bromofenol, 0,05 M de fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄ · 12H₂O), 50% (mL/mL) de glicerol, 10% (g/mL) de SDS, 200 mM de DTT</p> <p>Para o preparo de 40 mL do tampão de Laemmli, deve-se adicionar:</p> <ul style="list-style-type: none"> – 0,008 g de azul de bromofenol – 4 mL de solução estoque, 0,5 M de fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄ · 12H₂O), – 20 mL de glicerol – 4 g de SDS – completar o volume com água ultrapura para 40 mL <p>No momento de sua utilização, deve ser aquecido (100°C), tornando-se líquido, para possibilitar a dissolução do DTT. Para cada 1mL de Tampão de amostra deve-se acrescentar 0,15 g de DTT</p>	Armazenar à temperatura ambiente. Propicia o aumento da densidade da amostra e evidencia a separação eletroforética
Tris HCl a 1 M (pH 7,5 ou pH 6,8)	Dissolver 121 g de tris-base em aproximadamente 800 mL de água ultrapura. Ajustar o pH desejado com HCl (10 N) e ajustar o volume para 1 L	Armazenar de 4 a 20°C
EDTA a 0,2 M (pH 7,0)	Dissolver 18,6 g de EDTA em 200 mL de água ultrapura. Ajustar o pH para 7,0 com NaOH (10 N) e completar o volume para 250 mL com água ultrapura	Armazenar de 4 a 20°C
SDS a 10%	Para o preparo de 100 mL de solução de SDS a 10% (g/mL): dissolver 10 g de SDS em 100 mL de água ultrapura. Se necessário, promover leve aquecimento para auxiliar na dissolução	Armazenar à temperatura ambiente. Desnatura e confere carga negativa às proteínas. Utilizar máscara para manipulação do SDS em pó
HCl a 10 N	Para o preparo de 100 mL de solução, misturar na seguinte ordem: 13,8 mL de água ultrapura e 86,2 mL de HCl concentrado	Armazenar à temperatura ambiente. Utilizar máscara para manipulação do ácido e preparar a solução em capela
NaOH a 10 N	Para o preparo de 100 mL de solução, dissolver vagarosamente, com extremo cuidado, 40 g de NaOH em 100 mL de água ultrapura em béquer de plástico, na capela. O preparo desta solução envolve uma reação altamente exotérmica, que pode causar a quebra de recipientes de vidro. Como uma precaução adicional, pode-se colocar o béquer em banho de gelo	Armazenar à temperatura ambiente. Utilizar máscara para manipulação e preparar a solução em capela. Reação exotérmica

voltagem para 150 V, acelerando a separação eletroforética dos componentes da mistura. A eletroforese pode ser interrompida quando a linha azul, proveniente do marcador de frente (azul de bromofenol), presente no tampão de amostra (Tabela 23.1), ultrapassar o limite inferior dos vidros que sustentam o gel. Pode-se retardar o tempo de eletroforese estabelecendo-se uma voltagem de 15 V, por exemplo, por aproximadamente 12 horas. As especificações da cuba eletroforética fornecidas pelo fabricante devem ser consultadas para mais informações a respeito de quais são as voltagens ideais a serem aplicadas durante a eletroforese.

Transferência das Proteínas do Gel para a Membrana

1. Retirar um dos vidros que envolvem o gel, recortar e desprezar o gel de empilhamento. Colocar o gel de separação em tampão de transferência (Tabela 23.3), retirando o outro vidro. O tampão de transferência contém metanol, que é tóxico se inalado ou em contato com a pele, portanto, a transferência deve ser realizada utilizando-se luvas e máscara.
2. Recortar a membrana de nitrocelulose ou PVDF no tamanho do gel, fazendo uma marcação para

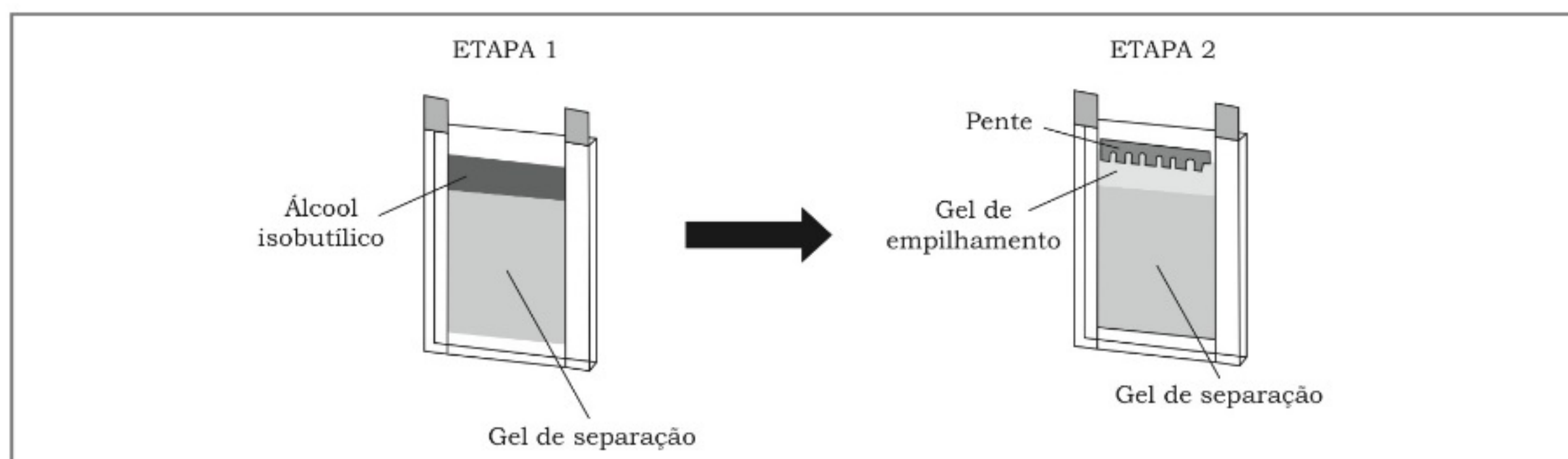


Figura 23.3 – Montar o sistema de acondicionamento do gel constituído por placas de vidro, as quais são separadas por espaçadores. Preparar a mistura do gel de separação (ver Tabela 5.5, Capítulo 5) e verter para o interior do sistema. Após a polimerização do gel de separação, acrescentar a mistura do gel de empilhamento (ver Tabela 5.6, Capítulo 5), encaixar o pente e aguardar a polimerização.

Tabela 23.2 – Preparo das soluções utilizadas no preparo do gel de poliacrilamida e na eletroforese do gel.

Soluções	Preparo	Observações/Utilizações
Persulfato de amônio (APS) a 10%	Para o preparo de 1 mL de solução de APS a 10% (g/mL) dissolver 0,1 g de APS em 1 mL de água ultrapura	Auxilia na polimerização do gel de poliacrilamida. A solução deve ser armazenada a 4°C e utilizada no prazo máximo de uma semana
TEMED	Comercial. Não requer pré-tratamento	Acelera a polimerização do gel. É estável a 4°C em frasco âmbar
Tampão para eletroforese em gel de poliacrilamida *(PAGE-SDS)	Preparar 2 L de solução estoque: 200 mM de Tris-base, 1,5 M de glicina, 7 mM de EDTA, 0,4% (g/mL) de SDS. Para isso, deve-se adicionar: – 48,45 g de tris-base – 228 g de glicina – 5,35 g de EDTA – 8 g de SDS – completar com água ultrapura para 2 litros	Para uso, a solução deve ser diluída com água ultrapura 1:4 volume/volume (v/v)

*PAGE-SDS: Eletroforese em gel de Polaculamida com Sulfato de Sódio Dodecila.

indicar a posição em que as amostras foram aplicadas. Quando for utilizada a membrana de PVDF, esta deve ser previamente imersa por 10 segundos em água ultrapura. Essa membrana tem características hidrofóbicas e este procedimento é necessário para torná-la apta para o processo de transferência. Os tipos de ligações das proteínas às membranas não são conhecidos, entretanto, a transferência pode ser prejudicada por gorduras e outras proteínas. Portanto, a membrana deve ser manuseada com luvas. Colocar a membrana, as esponjas e os papéis de filtro no tampão de transferência.

3. Montar um “sanduíche” em uma bandeja contendo o tampão de transferência na seguinte sequência (a partir do polo negativo): esponja, 3 folhas de papel de filtro, gel, membrana, 3 folhas de papel de filtro, esponja (esta última em contato com o polo positivo) (Fig. 23.4A). Retirar bolhas de ar entre todas as camadas com uma espátula, com bastante cuidado para não danificar a membrana ou o gel.

4) A transferência pode ser feita pela imersão completa do “sanduíche” em tampão, em um reservatório com eletrodos de platina (transferência de imersão – Fig. 23.4B) ou colocando o “sanduíche” molhado com tampão entre duas placas de eletrodos (*semi-dry*).

Para a transferência de imersão, deve-se completar o reservatório com tampão de transferência e inserir o “sanduíche” na orientação correta (as proteínas migram para o polo positivo, portanto, a membrana deve estar mais próxima ao lado positivo e o gel ao lado negativo). O “sanduíche” é colocado dentro do reservatório em suportes que o mantêm fixo e que são fornecidos com o equipamento. Geralmente, a célula de transferência possui um reservatório para gelo para evitar o aquecimento excessivo gerado durante a transferência. Submeter o sistema a uma diferença de potencial de 120 V, por cerca de uma hora, repondo o gelo no reservatório a cada 20 ou 30 minutos.

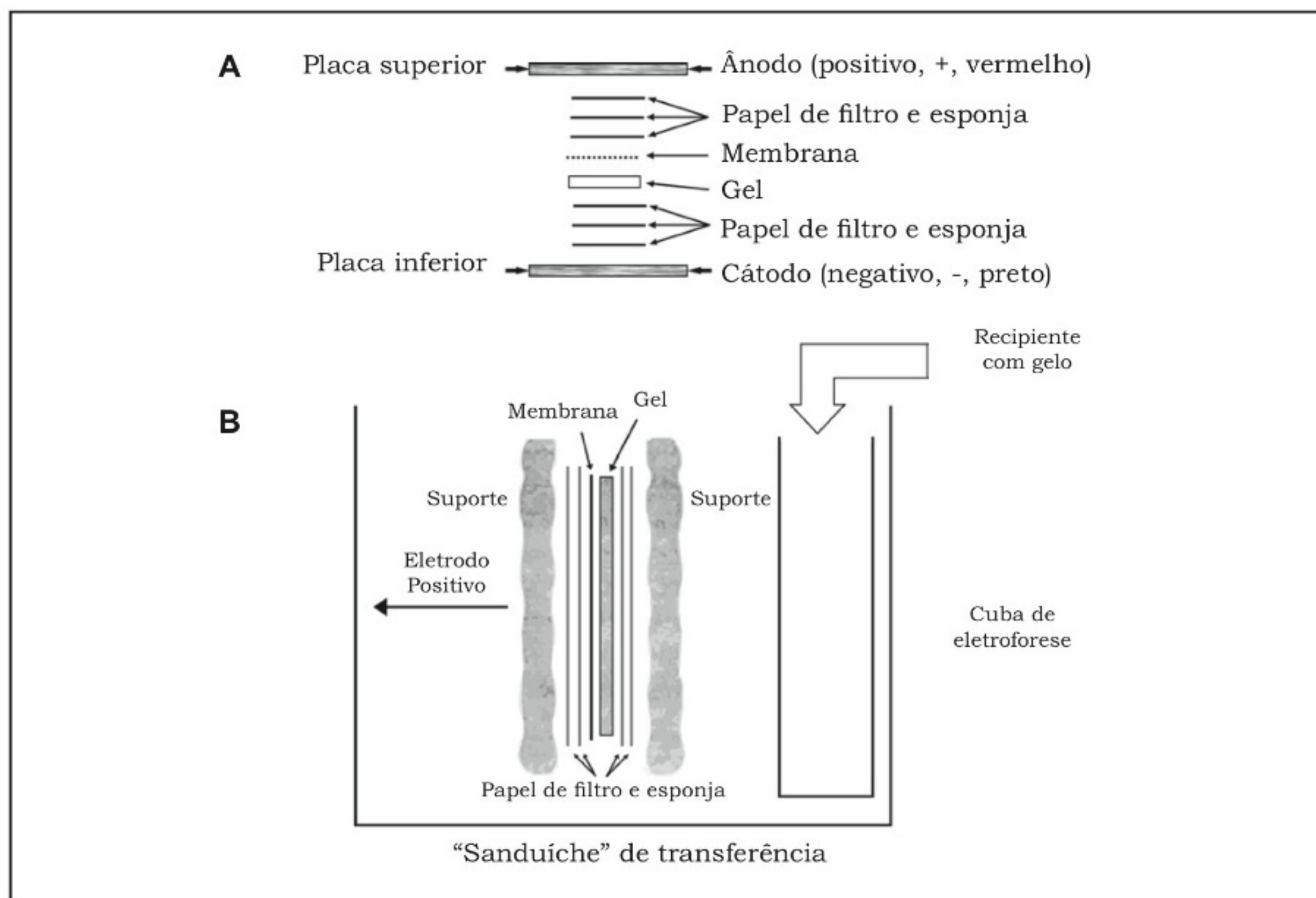


Figura 23.4– Esquema representativo da montagem do “sanduíche” para a transferência eletroforética de proteínas (A) e do posicionamento do gel dentro da cuba, em relação à membrana e aos eletrodos, para a transferência de imersão (B). Adaptado de: Harlow, E.; Lane, D. *Immunoblotting*. IN: *Using Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Plainview, New York: 1999. p. 267-309.

Para a transferência em *semi-dry*, deve-se deixar o “sanduíche” imerso em tampão de transferência por aproximadamente 10 minutos, antes da transferência propriamente dita, para que ocorra a diluição do tampão de corrida presente no gel. Após este tempo, o “sanduíche” deve ser colocado entre as placas de eletrodo. Deve-se observar a orientação correta da membrana em relação ao gel, lembrando que as proteínas migram para o polo positivo, no qual deve estar posicionada a membrana (Fig. 23.4).

Verificar no manual de instruções o tipo de tampão, a voltagem e o tempo de transferência recomendados para o equipamento que está sendo utilizado.

Após o término da transferência, a membrana deve ser acondicionada em um recipiente de plástico para todas as incubações necessárias. O recipiente deve ter dimensões discretamente superiores às da membrana, possibilitando que o volume das soluções que serão utilizadas nos passos seguintes seja suficiente para cobrir toda a superfície da membrana. Os volumes que serão sugeridos adiante são suficientes para cobrir uma membrana de 9×6 cm, em um recipiente de 10×7 cm. As incubações deverão ser feitas no agitador de bancada, mantendo-se a agitação constante até o final do processo.

Tabela 23.3 – Preparo das soluções empregadas na transferência e bloqueio da membrana.

Soluções	Preparo	Observações/Utilizações
Tampão de transferência de imersão	Preparar a solução contendo 192 mM de glicina, 25 mM de tris-base, 0,02% (g/mL) de SDS e 20% (mL/mL) de metanol, para transferência de imersão. Para o preparo de 2 L de solução, deve-se adicionar: – 28,82 g de glicina – 6,05 g de tris-base – 0,4 g de SDS – 400 mL de metanol – completar com água ultrapura para 2 litros	Utilizada para a transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE, para a membrana. Manusear com luvas e na capela, pois o metanol é tóxico
Tampão de transferência para <i>semi-dry</i>	Preparar solução contendo 39 mM de glicina, 48 mM de tris-base, 0,04% (g/mL) de SDS e 20% (mL/mL) de metanol, para transferência em <i>semi-dry</i> . Para o preparo de 1 L de solução, deve-se adicionar: – 2,9 g de glicina – 5,8 g de tris-base – 0,37 g de SDS – 200 mL de metanol – completar com água ultrapura para 1 litro	Utilizada para a transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE, para a membrana. Manusear com luvas e na capela, pois o metanol é tóxico
Solução de Ponceau	Para o preparo de 100 mL de solução, dissolver 1g do reagente Ponceau em 1 mL de ácido acético glacial. Completar o volume com água para 100 mL	Avaliar a eficiência da transferência das proteínas
NaCl 5 M	Para o preparo de 500 mL de solução, dissolver 141,6 g de NaCl em 500 mL de água ultrapura	Armazenar à temperatura ambiente
Solução basal	Preparar solução: cloreto de sódio 150 mM, Tris-HCl 10 mM, Tween 20 a 0,02% (mL/mL). Para o preparo de 1 L de solução, deve-se adicionar: – 10 mL do Tris-HCl a 1 M (pH 7,5) – 30 mL do NaCl a 5 M – 500 µL de Tween 20 – completar o volume para 1 litro com água ultrapura	Solução utilizada para o manuseio da membrana após a transferência das proteínas. Estocar a solução a 4°C se armazenada por longos períodos
Solução bloqueadora	Esta solução contém: 5% (g/mL) de leite em pó desnatado e 0,02% (g/mL) de azida sódica. Esta solução deve ser preparada utilizando-se a solução basal	Utilizada para incubar a membrana após a transferência das proteínas

Verificação da Eficiência da Transferência (Opcional)

1. Pode ser realizada a verificação da eficiência da transferência corando a membrana com 10 mL da solução de Ponceau (Tabela 23.3) por aproximadamente 2 minutos. O corante de Ponceau evidenciará as proteínas que foram transferidas, revelando o perfil eletroforético das proteínas separadas. Retirar a solução de corante de Ponceau (essa solução pode ser reutilizada) e acrescentar 20 mL de solução basal (Tabela 23.3) até que se observe a retirada do excesso de Ponceau, ou seja, a descoloração da membrana. A verificação da eficiência da transferência por meio da coloração de Ponceau é um passo opcional.
2. Para o bloqueio, a membrana deve ser incubada com 10 mL da solução bloqueadora (Tabela 23.3) sob agitação constante no agitador de bancada por cerca de 2 horas a temperatura ambiente, ou então por um período de 12 horas a temperatura de 4 a 8°C. As soluções de leite em pó desnatado ou a de albumina sérica bovina são compatíveis com quase todos os sistemas de detecção dos antígenos. A caseína do leite ou a albumina ligam-se às proteínas que estão inseridas na membrana, bloqueando as ligações inespecíficas. O anticorpo apresenta maior afinidade pela proteína específica, o que faz com que o anticorpo se ligue às proteínas inseridas na membrana, desligando a caseína ou a albumina. A caseína ou a albumina permanecem ligadas em regiões que não contêm a proteína de interesse, o que faz com que a revelação não apresente marcações de bandas interferentes, resultantes de ligações inespecíficas do anticorpo primário.

Quando o anticorpo primário for produzido em cabra, leite desnatado ou a albumina podem ser substituídos por gelatina 1,5%. Esse procedimento diminui marcação inespecíficas comumente formadas com a utilização desse tipo de anticorpo.

Detecção do Antígeno

1. A solução bloqueadora deverá ser descartada e a membrana deve ser lavada (agitação constante por 10 minutos) com solução basal para retirar o excesso da solução bloqueadora. O procedimento de lavagem deve ser repetido três vezes.
2. O passo seguinte é a incubação com o anticorpo primário. O anticorpo primário deve ser diluído na proporção recomendada pelo fabricante em solução basal acrescida de leite em pó desnatado, albumina

ou gelatina 1,5%, caso o anticorpo primário seja produzido em cabra, e azida sódica a 0,02% (g/mL) em um volume final de 10 mL. A azida sódica (conservante) é altamente tóxica por inalação ou em contato com a pele e, portanto, deve ser manuseada cuidadosamente e com luvas. A solução de anticorpo deve ser acrescentada à membrana, que será incubada por 4 horas à temperatura ambiente ou de 4 a 8°C por aproximadamente 12 horas. Neste caso, o recipiente deve ser coberto para que a solução não evapore.

3. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana deverá ser lavada com solução basal por 10 minutos – procedimento repetido três vezes.
4. O anticorpo secundário conjugado à peroxidase, adequado ao anticorpo primário, deverá ser diluído na concentração recomendada pelo fabricante (geralmente 1:10.000), em 10 mL de solução basal acrescida de 1% (g/mL) de leite em pó desnatado. A membrana deverá ser incubada com esta solução por 1 a 2 horas à temperatura ambiente.
5. Preparar a solução de revelação pela mistura de volumes iguais das soluções de revelações I e II (Tabela 23.4) ou pela mistura de volumes iguais das soluções 1 e 2 fornecidas no *kit* ECL (Amersham Pharmacia Biothec, Uppsala, Suécia). Essas soluções devem ser preparadas e misturadas no momento de sua utilização.
6. Lavar a membrana por três vezes com solução basal, como anteriormente. Com uma pipeta, gotejar a mistura do reagente sobre a membrana na região de migração da proteína e incubar à temperatura ambiente por 1 minuto, mantendo a membrana sob agitação constante para contato total de sua superfície com a solução de revelação.
7. Envolver a membrana com plástico transparente e retirar o excesso de solução, secando rapidamente com papel absorvente. Fixar com fita adesiva o plástico contendo a membrana em chassi radiográfico apropriado para a revelação de filmes de raios X.
8. Em sala apropriada para revelação de filmes de raios X, sobrepor o plástico com a membrana com o filme e expor por segundos a minutos. Imergir o filme em solução reveladora e manter por aproximadamente 1 minuto. Lavar com água e imergir o filme por mais 1 minuto na solução fixadora. Lavar bem o filme já revelado em água corrente.
9. Para identificação do resultado obtido, o filme de raio X já revelado e seco deve ser sobreposto às mem-

Tabela 23.4 – Preparo das soluções utilizadas no processo de revelação.

Soluções	Preparo	Observações/Utilizações
Luminol	Preparar solução 250 mM: para o preparo de 10 mL de solução, pesar 0,44 g em 10 mL de DMSO	Aliquotar e estocar em <i>freezer</i> (-20°C), em recipientes âmbar
Ácido <i>p</i> -cumárico	Preparar solução 90 mM: para o preparo de 10 mL de solução, pesar 0,15 g em 10 mL de DMSO	Aliquotar e estocar em <i>freezer</i> (-20°C), em recipientes âmbar
Solução de revelação I	Para o preparo de 10 mL de solução: 100 µL de luminol (2,5 mM final), 44 µL de ácido <i>p</i> -cumárico (400 µM final), 1 mL Tris-HCl 1M (pH 8,5; 100 µM final) e completar para 10 mL com água ultrapura	Preparar somente no momento de sua utilização
Solução de revelação II	Para o preparo de 10 mL de solução: 6,1 µL de H ₂ O ₂ (30%) (5,4 mM final), 1 mL Tris-HCl 1M (pH 8,5; 100 µM final) e completar com água ultrapura para 10 mL	Preparar somente no momento de sua utilização

Tabela 23.5 – Preparo das soluções utilizadas no processo de reutilização das membranas.

Soluções	Preparo	Observações/Utilizações
Solução de <i>stripping</i> (pH 2,8)	Preparar solução: glicina 0,2 M e NaCl 0,2 M Acertar o pH para 2,8 com HCl Para o preparo de 500 mL de solução, deve-se adicionar: – 7,5 g de glicina – 5,84 g de Na Cl – 400 mL de água ultrapura – Ajustar o pH para 2,8 com HCl e completar o volume para 500 mL com água ultrapura	Solução utilizada para a quebra da ligação do anticorpo com as proteínas na membrana. Estocar a solução a 4°C
NaOH 1N	Para o preparo de 1 L de solução, dissolver 40 g de NaOH em 1.000 mL de água ultrapura	Armazenar à temperatura ambiente

branas novamente para que a impressão radiográfica obtida seja comparada ao marcador pré-corado da membrana, que não necessariamente aparece marcado no filme. Comparando a altura da banda revelada com os marcadores na membrana, será possível avaliar se a banda revelada é a de interesse ou qual das bandas reveladas é a adequada, já que, alguns anticorpos podem se ligar a proteínas inespecíficas na membrana.

Detecção de outro Antígeno na mesma Membrana

A mesma membrana que foi utilizada poderá ser incubada novamente com outros anticorpos específicos para outros antígenos. Para isso, deve-se incubar a membrana com 20 mL de solução de *stripping* (Tabela 23.5) por 30 minutos, temperatura ambiente, sob constante agitação. Após os 30 minutos, deve-se acres-

centar 1,25 mL de NaOH 1N à solução de *stripping*, mantendo sob agitação constante por mais 30 minutos. A membrana deve, então, ser lavada com solução basal por três vezes com duração de 10 minutos por vez. Todo esse procedimento deve ser repetido por mais uma vez. Este procedimento possibilita a quebra da ligação do anticorpo com as proteínas na membrana, permitindo sua incubação com outro anticorpo para a detecção de outra proteína de interesse. Após o término de dois ciclos deste procedimento, a membrana deve ser incubada com solução bloqueadora e o procedimento a ser seguido deve ser igual ao realizado para a detecção da primeira proteína de interesse.

Referências

Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pober, J. S.; *Imunologia Cellular & Molecular*. 3ª ed. Livraria e Editora Revinter Ltda, 2000. p. 59-65. (Esse livro é uma tradução, o título origi-

- nal e editora são: Cellular and Molecular Immunology. W. B. Saunders Company)
- Analysis of proteins. In: Ausubel, F.M; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K.; In: *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Greene, Wiley, 1988. cap. 10.
- Burnette, W.N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112(2):195-203, 1981.
- Burridge, K. Changes in cellular glycoproteins after transformation: identification of specific glycoproteins and antigens in sodium dodecyl sulfate gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73(12):4457-4461, 1976
- Dunbar, B.S. ed. *Protein Blotting: A Practical Approach*. Oxford: IRL, Oxford University, 1994. 242p.
- Hames, B.D. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In: Hames, B.D.; Rickwood, D. eds. *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*. Oxford, Washington. IRL, 1981. cap., p. 1-91.
- Harlow, E.; Lane, D. Immunoblotting. In: *Using Antibodies. A Laboratory Manual*. eds. Plainview – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview – New York: 1999. p. 267-309.
- Heegaard, N.H.H.; Bjerrum, O.J. Immunoblotting – general principles and procedures. In: _____, eds. *CRC Handbook of Immunoblotting of Proteins*. (Technical descriptions, v. I) Boca Raton – Flórida: CRC Press, 1988. p. 1-25.
- Laemmli, V.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-686, 1970.
- Sambrook, J; Russell, D. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Plainview – New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344p.
- Southern, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98:503-517, 1975.
- Showe, M.K.; Isobe, E.; Onorato, L. Bacteriophage T4 prehead proteinase. II. Its cleavage from the product of gene 21 and regulation in phage-infected cells. *J Mol Biol.* 107(1):55-69, 1976.
- Towbin, H.; Gordon, J. Immunoblotting and dot immunobinding-current status and outlook. *J. Immunol. Method.*, 72(2):313-340, 1984.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76(9):4350-4354, 1979.

24. Identificação das Proteínas por meio da Eletroforese 2D

Marisa D'Innocenzo

Introdução

A eletroforese bidimensional (eletroforese 2D) é uma técnica muito eficiente e um método bastante utilizado para a análise de misturas complexas de proteínas extraídas de células, tecidos ou outras amostras biológicas. Esta técnica separa as proteínas de acordo com duas propriedades independentes em duas etapas discriminadas: a etapa da primeira dimensão, focalização isoeletrica (IEF), separa as proteínas de acordo com seu ponto isoeletrico (pI); a etapa da segunda dimensão, eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE), separa proteínas de acordo com seu peso molecular (M_r = peso molecular relativo). Cada ponto (*spot*) na matriz bidimensional resultante corresponde a uma única proteína na amostra. Milhares de proteínas diferentes podem assim ser separadas e podem ser obtidas as informações sobre seu peso molecular aparente, o ponto isoeletrico e a quantidade de cada proteína.

A eletroforese bidimensional foi introduzida por O'Farrell (1975) e Klose (1975). Na técnica original, a separação na primeira dimensão era feita em géis de poliacrilamida contendo anfólitos preparados em tubos de vidro muito finos.

O poder da eletroforese 2D como uma técnica bioquímica de separação tem sido reconhecida teoricamente desde sua introdução. Todavia, sua aplicação tornou-se importante somente nos últimos anos, como resultado de uma série de desenvolvimentos:

- A introdução dos gradientes de pH imobilizados (Bjellqvist et al., 1982) trouxe resolução e reprodutibilidade superiores à primeira dimensão. Baseados neste conceito, Görg et al. (1985, 1988 e 1995) desenvolveram a técnica atualmente empregada para 2D, na qual os gradientes de pH gerados por anfólitos carreadores foram substituídos por gradientes imobilizados de pH, e os géis em tubos por géis em suporte plástico.

- Novas técnicas de espectrometria de massas têm sido desenvolvidas, as quais permitem a identificação rápida e a caracterização de quantidades muito pequenas de peptídeos e proteínas extraídos de *spots* 2D.
- A avaliação computadorizada dos perfis altamente complexos de 2D tornou-se algo possível, uma vez que existem hoje computadores mais potentes e de mais baixo custo, além de programas específicos disponíveis para as análises.
- Dados de genomas, para vários organismos, estão disponíveis, o que permite rápida identificação de um gene codificando uma proteína separada por eletroforese 2D.
- A *Web* promove acesso simples e direto aos bancos de dados de perfis de *spots* para a comparação de resultados de eletroforese e dados de sequências de genomas para a consolidação da informação da sequência de peptídeos.

Uma aplicação para a eletroforese 2D é a “análise do proteoma”, que é a “análise do complemento total de proteínas expresso por um genoma” (Wilkins et al., 1996; Pennington et al., 1997). Esta análise envolve a separação, a identificação e a quantificação sistemática de muitas proteínas simultaneamente a partir de uma única amostra. A eletroforese bidimensional é utilizada nesta técnica devido a sua eficiência inigualável de separar milhares de proteínas ao mesmo tempo. A eletroforese bidimensional é também única em detectar modificações pós e cotraducionais, que não podem ser previstas a partir de uma sequência de genoma. Algumas aplicações para eletroforese bidimensional incluem análise de proteomas, diferenciação celular, detecção de marcadores para doenças, monitoramento de terapias, descoberta de novas drogas, pesquisa em câncer, verificação de pureza e purificação de proteínas em microescala. Neste capítulo vamos descrever métodos para eletroforese bidimensional discorrendo so-

bre o método tradicional e utilizando géis prontos como para a primeira dimensão (*IPG strips: Immobiline DryStrip da antiga Amersham Biosciences, hoje 6E Healthcanelife-Sciences*).

O processo de eletroforese bidimensional é iniciado com a preparação de amostra. O preparo adequado da amostra é essencial para um bom resultado de 2D. Com a nova tecnologia, o passo seguinte no processo de 2D é a reidratação das fitas IPG antes da IEF. A primeira dimensão (IEF) é desenvolvida sob voltagens elevadas com controle preciso da temperatura. Após a focalização, faz-se o equilíbrio das tiras de gel com um tampão contendo SDS, para que a amostra esteja preparada para as condições do SDS-PAGE, a segunda dimensão. Após a segunda dimensão, os passos finais são a visualização e a análise dos resultados da matriz bidimensional de *spots* do gel. Em suma, a sequência experimental para eletroforese bidimensional é como segue:

- a) Preparação da amostra.
- b) Reidratação da tira de gel.
- c) IEF (ou primeira dimensão).
- d) Equilíbrio da tira de gel.

- e) SDS-PAGE (ou segunda dimensão).
- f) Visualização.
- g) Análise.

Um resultado típico da eletroforese bidimensional com amostra sem fracionamento (todo o conteúdo proteico) é mostrado na figura 24.1.

Preparo de Amostra

Estratégia Geral

A preparação da amostra é essencial para um bom resultado de 2D. Devido à grande diversidade de tipos e origem das amostras, serão abordadas neste capítulo somente linhas gerais para o preparo destas. O procedimento ótimo deverá ser atingido pelo pesquisador, determinando-se empiricamente as condições ideais para cada tipo de amostra.

O processo deve resultar, idealmente, em solubilização completa, desagregação, desnaturação e redução das proteínas na amostra.

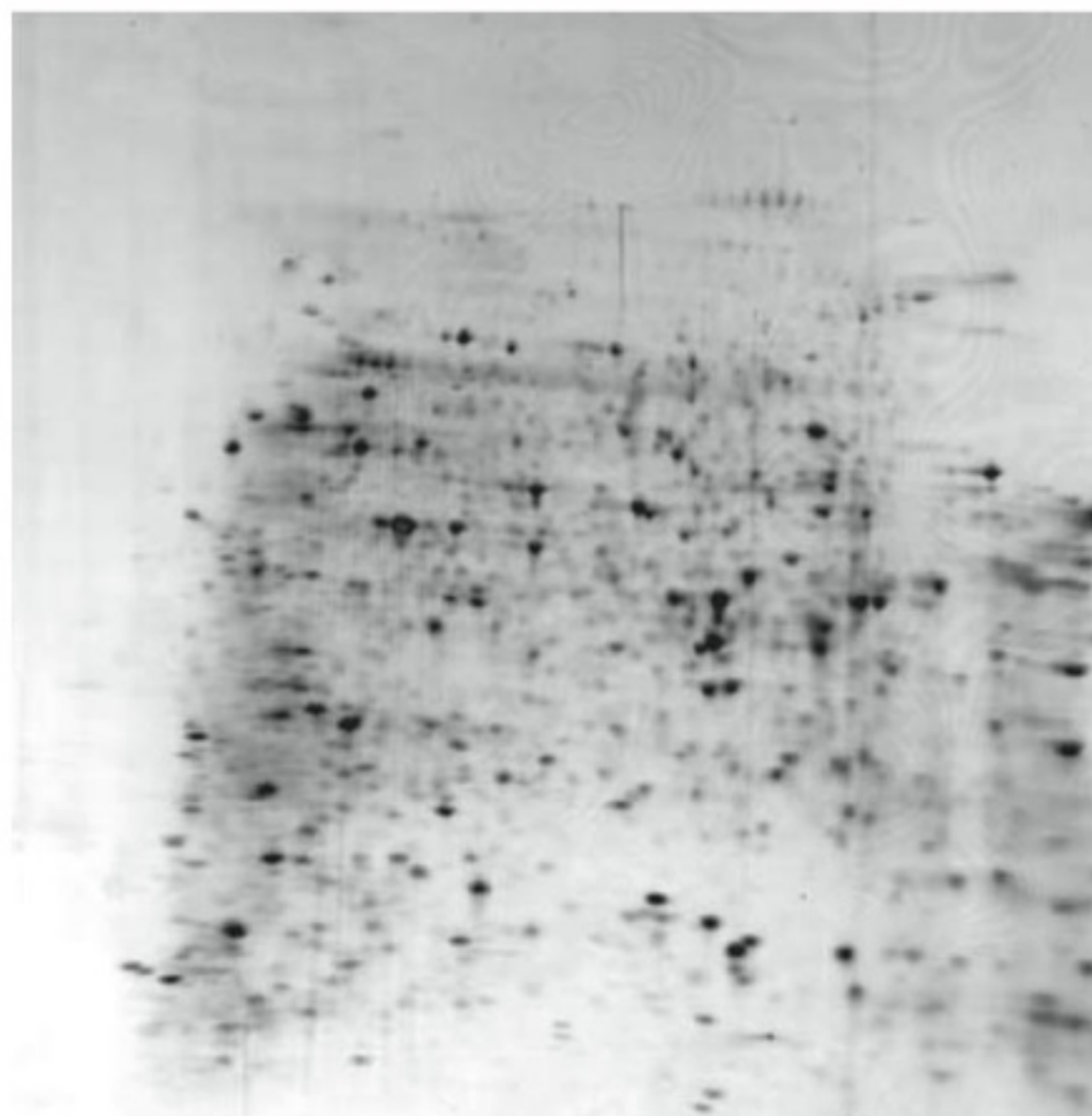


Figura 24.1 – Este gel foi obtido pela adição da amostra a um tampão simples, contendo 8 M de ureia, 0,5% de Triton X-100, 20mM de DTT e 0,5% de anfólitos. Imagem obtida no site: [www.aber.ac.uk/parasitology/Proteome/Tut 2d](http://www.aber.ac.uk/parasitology/Proteome/Tut%202d).

Quando se está desenvolvendo um método de preparação de amostra, é importante se ter em mente o que se deseja do resultado final da 2D. Qual será o objetivo: ver o máximo de proteínas possível ou somente uma fração das proteínas que é de potencial interesse na amostra? O que é mais importante: a representação completa da amostra ou um perfil claro e reproduzível? Passos adicionais na preparação de amostra podem aumentar a qualidade do resultado final, mas cada passo adicional pode resultar em perda seletiva de espécies de proteínas. Deve-se ter a medida certa entre melhoria da qualidade da amostra e sua representação completa, para se trabalhar com cautela.

Para analisar completamente todas as proteínas, as células devem ser efetivamente rompidas. A escolha do método de ruptura das células depende da origem da amostra: se é a partir de células, tecidos sólidos ou outro material biológico e se a análise é para todas as proteínas ou somente alguma fração subcelular em particular. Tanto a lise suave quanto a vigorosa serão abordadas adiante.

Durante a ruptura celular, as proteases podem ser liberadas. A proteólise complica muito a análise dos resultados de 2D e, portanto, a amostra de proteína deve ser protegida da proteólise durante a ruptura das células e as preparações subsequentes.

Se o interesse é somente em uma fração particular das proteínas do tecido ou tipo de célula, o pré-fracionamento pode ser empregado durante o preparo da amostra. Se as proteínas de um compartimento subcelular são desejadas (por exemplo, núcleo, mitocôndria, membrana citoplasmática), a organela de interesse pode ser purificada por centrifugação diferencial ou outros meios antes da solubilização das proteínas para a eletroforese 2D. A amostra pode ser também pré-fracionada por solubilidade sob diferentes condições de extração. Alguns trabalhos de revisão podem ser consultados sobre técnicas de fracionamento de proteínas (Lenstra, 1983; Molloy et al., 1998; Ramsby, Makowski e Khairallah, 1994; Taylor et al., 2000 e Deutscher, 1990).

Métodos de Rompimento de Células

As tabelas 24.1 e 24.2 apresentam alguns métodos de rompimento de células, tanto mecânicos quanto químicos, de forma suave ou mais vigorosa. O rompimento celular deve ser feito a temperaturas baixas, mantendo as amostras em banho de gelo o máximo possível e utilizando as soluções geladas. Estes e outros exemplos de métodos de ruptura de células podem ser encontrados nas

referências: Görg, Postel e Günther, 1988; Görg et al., 1995; Lenstra e Bloemendal, 1983; Bollag e Edelstein, 1991; Dignam, 1990; Toda et al., 1994; Cull e McHenry, 1990; Jazwinski, 1990; Kawaguchi e Kuramitsu, 1995; Teixeira-Gomes et al., 1997; Ames e Nikaido, 1976; Görg et al., 1988; Posch et al., 1995; Geigenheimer, 1990; Wolpert e Dunkle, 1983; Blomberg et al., 1995.

Proteção contra Proteases

Um vez rompidas as células, as proteases podem ser ativadas, degradando as proteínas e dificultando, dessa forma, o resultado esperado na 2D. Todas as medidas possíveis devem ser consideradas para evitar a ação de proteases. Se possível, inibir as proteases pela ruptura celular da amostra diretamente em desnaturantes fortes, como ureia a 8 M, ácido tricloroacético (TCA) a 10% ou Sulfato de Sódio Dodecila (SDS) a 2% (Darmerval et al., 1986; Colas des Francs, Thiellement e de Vienne, 1985). Todavia, algumas proteases podem manter sua atividade até mesmo sob estas condições e nestes casos deve-se utilizar um inibidor de proteases. Existe uma grande gama de inibidores de proteases disponível comercialmente, bem como coquetéis com misturas destes. Os inibidores de proteases mais comuns e as proteases que eles inibem estão listados na tabela 24.3.

Procedimentos de Precipitação

A precipitação de proteínas é um passo opcional na preparação de amostra para eletroforese 2D. A precipitação, seguida de ressuspensão na solução da amostra, é geralmente empregada para separar seletivamente as proteínas na amostra a partir de espécies contaminantes, tais como sais, detergentes, ácidos nucleicos, lipídios etc., que interferem no resultado 2D. Outro objetivo pode ser o preparo de uma amostra de proteína mais concentrada a partir de um extrato diluído (por exemplo, tecidos de plantas, urina). Métodos comuns de precipitação de proteínas em uma amostra estão citados na tabela 24.4.

Remoção de Contaminantes que Afetam os Resultados da Eletroforese 2D

As impurezas não proteicas na amostra podem interferir com a separação e subsequente visualização do resultado de 2D, logo, a preparação de amostra inclui passos em que se removem em estas substâncias, conforme apresentado na tabela 24.5.

Tabela 24.1 – Métodos suaves de ruptura de células.

Método de ruptura de célula	Aplicação	Procedimento geral
Lise osmótica Método bastante delicado, muito usado quando se deve subfracionar a amostra em componentes subcelulares	Células de sangue e de cultura de tecidos	– Suspender as células em solução hipo-osmótica.
Lise por congelamento e descongelamento Muitas células podem ser rompidas por ciclos de congelamento e subsequente descongelamento	Células de bactérias e de culturas de tecidos	– Congelar rapidamente a suspensão de células utilizando nitrogênio líquido e, em seguida, descongelar. – Repetir o procedimento.
Lise enzimática Células com paredes celulares podem ser lisadas delicadamente após a lise da parede celular Isso pode ser conseguido com uma enzima específica para o tipo de célula a ser lisado (exemplo, lisozima para células de bactérias, celulase e pectinase para células vegetais, liticase para leveduras)	Tecidos vegetais, células de bactérias e de fungo	– Tratar as células com a enzima em solução iso-osmótica.
Lise por detergente Solubiliza membranas celulares, rompendo células e liberando seu conteúdo	Células de cultura de tecidos	– Suspender as células em solução contendo detergente. – As células podem ser lisadas diretamente na solução da amostra ou solução de reidratação, uma vez que estas sempre contêm detergentes. – Se um detergente aniônico como o SDS é utilizado para a lise, um dos dois passos de preparação deve ser utilizado para assegurar que o SDS não interferirá na IEF: a) diluir a amostra lisada em uma solução contendo excesso de detergente não iônico ou zwitteriônico, ou b) separar o SDS da amostra de proteínas por precipitação com acetona (ver tabela 24.4 – procedimentos de precipitação)

Tabela 24.2 – Métodos vigorosos de ruptura de células.

Método de ruptura de célula	Aplicação	Procedimento geral
Sonicação O sonificador gera ondas ultrassônicas que rompem as células por força de separação	Suspensões de células	– Sonicar a suspensão em pequenos intervalos de tempo para evitar aquecimento. Utilizar o resfriamento em gelo entre os intervalos
Célula de Pressão Francesa <i>(French Pressure Cell)</i> Células são lisadas por separação por meio da força de passagem das células por um pequeno orifício sob alta pressão	Microorganismos com paredes celulares (bactérias, algas, leveduras)	– Colocar a suspensão de células na Célula de Pressão Francesa resfriada. Aplicar a pressão e coletar o lisado extrudado
Maceração Alguns tipos de células podem ser abertos por maceração manual com <i>graal</i> e pistilo	Tecidos sólidos, microorganismos	– Tecidos ou células são normalmente congelados com nitrogênio líquido e macerados até um pó fino. A alumina (Al_2O_3) ou areia pode ajudar na maceração
Homogeneização com esfera de vidro A ação abrasiva das esferas com vórtice rompe as paredes celulares, liberando o conteúdo celular	Células em suspensão, microorganismos	– Suspender as células em um volume igual de solução de lise refrigerada e colocar no tubo para vórtice. Adicionar 1 a 3 g de esferas de vidro por g de tecido úmido. Vórtice por 1 minuto e incubar as células em gelo por 1 minuto. – Repetir utilizando o vórtice e o gelo por 2 a 4 vezes
Homogeneização mecânica Muitos equipamentos diferentes podem ser utilizados para homogeneizar tecidos mecanicamente. Os homogeneizadores como Potter-Elvehjem ou o Dounce podem ser utilizados para romper células de tecidos relativamente macios. Os Blenders ou outros aparatos motorizados podem ser utilizados para amostras de maior quantidade. A homogeneização é rápida e acarreta pouco dano às proteínas, exceto pelas proteases que podem ser liberadas com o rompimento	Tecidos sólidos	– Cortar o tecido em pedaços pequenos se necessário. Adicionar o tampão de homogeneização gelado (5 a 20 vezes o volume de tecido). Homogeneizar brevemente. Clarear o lisado por filtração e/ou centrifugação

Tabela 24.3 – Inibidores de proteases.

Inibidor de proteases	Efetivo contra	Limitações
PMSF (<i>Fenilmetilsulfonil fluoreto</i>) Inibidor mais comumente utilizado a concentrações de até 1 mM	PMSF é um inibidor irreversível que inativa serino e algumas cisteínoproteases	<ul style="list-style-type: none"> – PMSF torna-se inativo rapidamente em soluções aquosas: deve ser preparado imediatamente antes do uso – PMSF pode ser menos efetivo em presença de reagentes com grupos tióis, como ditioneitol (DTT) ou 2-mercaptoetanol. Esta limitação pode ser transposta pela ruptura da amostra em solução contendo PMSF sem os tióis, que podem ser adicionados em outra etapa da preparação – PMSF é muito tóxico
AEBSF <i>Aminoetil benzilsulfonil fluoreto</i> ou Pefabloc SC inibidor de serinoproteases	AEBSF é similar ao PMSF em sua atividade inibitória, mas é mais solúvel e menos tóxico	As modificações induzidas pelo AEBSF podem potencialmente alterar o pI de uma proteína
EDTA ou EGTA Geralmente utilizado na concentração de 1 mM	Estes compostos inibem metaloproteases por quelar os íons metálicos livres requeridos para sua atividade	
Peptídeos inibidores de proteases (exemplo, leupeptina, pepstatina, aprotinina, bestatina) <ul style="list-style-type: none"> – inibidores reversíveis – ativos na presença de DTT – ativos a baixas concentrações sob uma variedade de condições uso: 2 a 20 µg/mL	A leupeptina inibe muitas das serino-e cisteínoproteases. A pepstatina inibe aspartilproteases (exemplo, proteases ácidas tais como a pepsina) A aprotinina inibe muitas das serinoproteases A bestatina inibe as aminopeptidases	Os peptídeos inibidores de protease são: <ul style="list-style-type: none"> – de alto custo – pequenos peptídeos, assim, podem aparecer no mapa 2D, dependendo da faixa de tamanho molecular separada pelo gel da segunda dimensão. – A pepstatina não inibe nenhuma protease que seja ativa a pH 9,0
TLCK, TPCK (<i>tosil lisina cloroetil cetona, tosil fenil clorometil cetona</i>) uso: 0,1 a 0,5 mM	Estes compostos similares inibem irreversivelmente a atividade de muitas das serino e cisteínoproteases	
Benzamidina Uso: 1 a 3 mM	A benzamidina inibe as serinoproteases	

Tabela 24.4 – Procedimentos de precipitação.

Método de precipitação	Procedimento geral	Limitações
Precipitação com sulfato de amônio (precipitação salina – <i>salting out</i>) Na presença de altas concentrações de sais, as proteínas tendem a agregar e precipitar, saindo da solução. Muitos contaminantes potenciais (exemplo. ácidos nucleicos) vão permanecer em solução	Preparar a proteína de tal forma que a concentração inicial da solução seja maior que 1 mg/mL em tampão que seja maior que 50 mM e contenha EDTA. Vagarosamente adicionar sulfato de amônio a um determinado percentual de saturação (Englard e Seiffer, 1990) e agitar por 10 a 30 minutos As proteínas são sedimentadas por centrifugação	<ul style="list-style-type: none"> – Muitas proteínas permanecem solúveis a altas concentrações de sal, portanto este método não é recomendado quando a representação total de proteínas é desejada. – Este método pode, contudo, ser utilizado preferencialmente para o pré-fracionamento ou enriquecimento. – O sulfato de amônio residual irá interferir com a IEF e, portanto, deve ser removido (Cremer e Van de Walle, 1985)
Precipitação com TCA TCA (ácido tricloroacético) é um precipitador de proteínas bastante efetivo	O TCA é adicionado ao extrato a uma concentração final de 10 a 20% e as proteínas são deixadas para precipitar em banho de gelo por 30 minutos (Guy, Philip e Tan, 1994)	<ul style="list-style-type: none"> – As proteínas podem ser difíceis de ressolubilizar e podem não ressolubilizar completamente. – O TCA residual deve ser removido por lavagens extensivas com acetona ou etanol. – Exposição extensiva a esta solução de baixo pH pode causar degradação ou modificação de proteínas.
Precipitação com acetona Seu uso é bastante comum como precipitador de proteínas Muitos contaminantes solúveis em solventes orgânicos (exemplo, detergentes, lipídios) vão permanecer em solução.	Adicionar pelo menos 3 volumes de acetona gelada ao extrato. Deixar as proteínas precipitarem a -20°C por pelo menos 2 horas. Sedimentar as proteínas por centrifugação (Guy, Philip e Tan, 1994; Holloway e Arundel, 1988; Matsui et al., 1997). A acetona residual é removida por secagem ao ar ou liofilização	
Precipitação com TCA em acetona A combinação do TCA e acetona é bastante comum durante o preparo de amostras para eletroforese 2D e é mais efetiva do que cada um isoladamente	Suspender o lisado em 10% de TCA em acetona com 0,07% de 2-mercapto-etanol ou 20 mM de DTT. Precipitar as proteínas por pelo menos 45 minutos a -20°C. Sedimentar as proteínas por centrifugação e lavar o sedimento com acetona gelada contendo 0,07% de 2-mercapto ou 20 mM de DTT. Remover a acetona residual por secagem ao ar ou liofilização (Görg, Postel e Günther, 1988a; Görg et al., 1988; Damerval et al., 1986; Granier, 1988; Tsugita et al. 1996; Görg et al., 1997)	<ul style="list-style-type: none"> – As proteínas podem ser difíceis de ressolubilizar e podem não ressolubilizar completamente – Exposição extensiva a esta solução de baixo pH pode causar alguma degradação ou modificação de proteínas
Precipitação com acetato de amônio e metanol após extração com fenol Esta técnica tem sido bem-sucedida com amostras de plantas contendo altos níveis de substâncias interferentes	As proteínas na amostra são extraídas em fenol saturado com água ou tampão. As proteínas são precipitadas a partir da fase fenólica com acetato de amônio 0,1 M em metanol. O sedimento é lavado várias vezes com acetato de amônio em metano e então com acetona. A acetona residual é evaporada (Hurkman e Tanaka, 1986; Granier, 1988; Usuda e Shimogawara, 1995)	<ul style="list-style-type: none"> – Este método é complicado e demorado

Tabela 24.5 – Contaminantes que afetam os resultados de 2D.

Contaminante	Razão para remoção	Técnicas de remoção
Sais, tampões residuais e outras moléculas pequenas carregadas que podem ser carregados durante a preparação da amostra	Os sais alteram o processo de eletroforese e devem ser removidos ou mantidos a concentrações mais baixas possíveis. Os sais em uma tira do tipo IPG resultam em alta condutividade no gel. A focalização das proteínas não irá ocorrer até os íons terem sido removidos ao final do gel, prolongando então o tempo para a IEF. Também pode ocorrer movimento da água em direção ao final do gel, resultando em ressecamento da tira em uma região e excesso de líquido em outra. O sal no gel pode resultar em regiões, nas extremidades da tira, que acarretam listras horizontais ou regiões vazias no resultado 2D. A concentração de sal no gel reidratado com a amostra não deve ultrapassar 10 mM. Se a amostra é aplicada com copos aplicadores, pode-se tolerar uma concentração de sal de até 50 mM na amostra, todavia, as proteínas podem precipitar no seu ponto de aplicação, uma vez que elas devem mover-se abruptamente para um ponto com baixa concentração salina	A desalinização pode ser feita por meio de: <ul style="list-style-type: none"> – diálise – <i>spin</i> diálise – filtração em gel – precipitação/ressuspensão
Pequenas moléculas iônicas endógenas (nucleotídeos, metabólitos, fosfolípidos etc.)	As pequenas moléculas iônicas podem estar presentes em qualquer lisado celular. Normalmente, estas substâncias são negativamente carregadas e podem resultar em focalização inadequada na região anódica	<ul style="list-style-type: none"> – A precipitação com TCA/acetona é particularmente efetiva na remoção deste tipo de contaminante. – Outras técnicas de desalinização podem ser aplicadas.
Detergentes iônicos	Os detergentes iônicos (geralmente SDS) são frequentemente utilizados durante a extração e solubilização de proteínas, mas podem afetar drasticamente a IEF. O SDS forma complexos com as proteínas e o complexo resultante negativamente carregado não vai focalizar, a menos que o SDS seja removido ou sequestrado	<ul style="list-style-type: none"> – Diluir a amostra contendo SDS em uma solução de reidratação que contenha detergente zwitteriônico ou não iônico (CHAPS, Triton X-100TM, ou NP40), tal que a concentração final de SDS seja 0,25% ou menor e a relação entre o outro detergente e o SDS seja pelo menos de 8:1 (Ames e Nikaido, 1976). A precipitação com acetona vai remover parcialmente o SDS. A precipitação à temperatura ambiente vai maximizar a remoção do SDS, mas a precipitação da proteína é mais completa a -20°C (Cremer Van de Walle, 1985).
Ácidos nucleicos (DNA, RNA)	Os ácidos nucleicos aumentam a viscosidade da amostra causando um fundo arrastado no mapa 2D. Os ácidos nucleicos de alto peso molecular podem entupir os poros do gel. Também podem ligar-se a proteínas por meio de interações eletrostáticas, prevenindo a focalização. Se a amostra protéica separada for visualizada por coloração com prata, os ácidos nucleicos presentes no gel vão corar também, resultando em <i>background</i> no mapa 2D	<ul style="list-style-type: none"> – Tratar as amostras ricas em ácidos nucleicos com uma mistura de DNase/RNase livre de proteases. Pode-se adicionar 0,1 vez o volume da solução contendo 1 mg/mL de DNase I, 0,25 mg/mL RNase A e 50 mM de MgCl₂, seguido por incubação em banho de gelo (Blomberg et al., 1995; Flengsrud e Kober, 1989). As enzimas RNase e DNase irão aparecer no mapa 2D – A ultracentrifugação pode ser utilizada para remover ácidos nucleicos grandes, contudo também pode remover as proteínas de alto peso molecular – Quando utilizar condições de extração de baixa força iônica, os ácidos nucleicos negativamente carregados podem formar complexos com as proteínas carregadas positivamente. Altas forças iônicas na extração podem minimizar estas interações (remover os sais em passos posteriores)

Tabela 24.5 – Continuação.

Contaminante	Razão para remoção	Técnicas de remoção
Materiais insolúveis	Podem obstruir os poros do gel de IEF, resultando em focalização ruim. Os materiais insolúveis são problemáticos quando a amostra é aplicada com recipientes de amostra (<i>sample cups</i>) e menos com a reidratação do gel. Eles dificultam a entrada das proteínas no gel	– As amostras devem ser clarificadas por centrifugação antes da aplicação à primeira dimensão
Compostos fenólicos	Estão presentes em muitos tecidos vegetais e podem modificar as proteínas por meio de reações oxidativas catalisadas por enzimas	<ul style="list-style-type: none"> – Prevenir por meio do emprego de agentes redutores durante a extração do tecido (exemplo, DTT, 2-mercaptoetanol, sulfeto, ascorbato). – Separar rapidamente as proteínas dos compostos fenólicos por técnicas de precipitação. – Inativar a fenol-oxidase com inibidores tais como tioureia. – Remover compostos fenólicos por adsorção com Polivinil pirrolidona (PVPP)
Lipídios	Muitas proteínas, particularmente as de membrana, são complexadas com lipídios. Isto reduz sua solubilidade e pode afetar o pI e o peso molecular. Os lipídios formam complexos com detergentes, reduzindo sua efetividade como agente solubilizador de proteínas. Quando se centrifuga um extrato de tecido rico em lipídios, normalmente existe um camada difícil de remover	<ul style="list-style-type: none"> – Condições altamente desnaturantes e detergentes minimizam as interações lipídios-proteínas. Excesso de detergente pode ser necessário. – A precipitação com acetona remove alguns lipídios
Polissacarídeos	Os polissacarídeos podem entupir os poros do gel de IEF, causando precipitação ou aumentando o tempo de focalização, resultando em arraste horizontal no mapa 2D. Alguns polissacarídeos são carregados negativamente e podem complexar com as proteínas por interação eletrostática	<ul style="list-style-type: none"> – Precipitar a amostra com TCA, sulfato de amônio ou fenol e acetato de amônio, e centrifugar. – Alguns métodos utilizados para prevenir interações com ácidos nucleicos podem ajudar na remoção de polissacarídeos, como ultracentrifugação, por exemplo

Composição da Amostra

De modo a se obter uma separação de primeira dimensão bem focalizada, as proteínas devem estar bem desagregadas e completamente solubilizadas. Para tanto, a solução de amostra deve conter ureia, detergente, anfólitos carreadores e agente redutor.

A desnaturação completa assegura que todas as proteínas estejam na mesma configuração e que a agregação e a interação intermoleculares sejam evitadas.

A ureia solubiliza e desdobra a maioria das proteínas a sua conformação completamente randômica, com todos os grupos ionizáveis expostos à solução. Mais recentemente, o uso de tiourea em adição à ureia tem melhorado a solubilização, especialmente para proteínas de membranas (Molloy et al., 1998; Rabilloud et al., 1997; Musante, Candiano e Ghiggeri, 1997; Pasquali, Fialka e Huber, 1997; Rabilloud, 1998).

Um detergente deve sempre ser incluído na solução de amostra para assegurar a solubilização completa da amostra e prevenir a agregação por meio de interações hidrofóbicas. Originalmente, NP – 40 ou Triton X-100 (não iônicos) eram usados. Alguns estudos demonstraram que o detergente zwitteriônico CHAPS é mais efetivo (Laemmli, 1970).

Os agentes redutores devem ser incluídos na solução da amostra para romper qualquer ponte dissulfeto presente e manter todas as proteínas em seu estado completamente reduzido. O agente redutor mais comumente utilizado é o DTT ou ditioeritrol (DTE) a concentrações entre 20 e 100 mM.

Os anfólitos carreadores ou IPG Buffer (até a concentração de 2% v/v) podem ser incluídos na solução de amostra. Eles aumentam a solubilidade das proteínas minimizando a agregação devido a interações carga-carga.

A amostra deve permanecer em solução à temperatura ambiente por pelo menos 30 minutos para completa desnaturação e solubilização antes da centrifugação e aplicação da IEF. O aquecimento da amostra com detergente pode ser feito para ajudar a solubilização, porém somente antes da adição de ureia.

Para um primeiro experimento com uma amostra desconhecida, uma solução de amostra-padrão como esta pode ser utilizada:

Dissolver as proteínas em:

- Ureia a 8 M, CHAPS a 4%, DTT a 60 mM, Pharmalyte a 6% (ou tampão de IPG – contendo 2% de

anfólitos com faixa de pH de 3 a 10), 0,002% de azul de bromofenol.

Para amostras com proteínas grandes e mais hidrofóbicas, o seguinte procedimento é recomendado:

- Ureia a 7 M, tiourea a 2 M, CHAPS a 4%, DTT a 60 mM, 2% Pharmalyte a 2% (ou tampão de IPG – contendo 2% de anfólitos com faixa de pH de 3 a 10), 0,002% de azul de bromofenol.

Para amostras de tecido que são fontes diluídas de proteínas e contêm alto nível de interferentes, como tecidos de plantas, recomenda-se:

- Macerar em *grail* com pistilo em nitrogênio líquido. Suspender o pó fino em de TCA a 10%, DTT a 0,3% em acetona. Manter a -18°C por 16 horas e centrifugar. Lavar o sedimento com acetona. Secar e ressuspender em ureia a 9 M, CHAPS a 2%, DTT a 1%, Pharmalyte a 2% (ou tampão de IPG – contendo 2% de anfólitos com faixa de pH de 3 a 10), 0,002% de azul de bromofenol.

Focalização Isoelétrica ou Primeira Dimensão (IEF)

A focalização isoeletrica (IEF) é um método eletroforético que separa as proteínas de acordo com seus pontos isoeletricos (pI). As proteínas são moléculas anfotéricas; elas carregam cargas líquidas positivas, negativas ou nulas, dependendo do pH da solução que a contém (Fig. 24.2).

A carga líquida de uma proteína é a soma de todas as cargas positivas e negativas das cadeias laterais de seus aminoácidos e terminal carboxílico. O ponto isoeletrico é o pH específico no qual a carga líquida da proteína é nula. As proteínas são positivamente carregadas em valores de pH abaixo do seu pI e negativamente carregadas em valores de pH acima de seu pI.

A presença de um gradiente de pH é crítico para a técnica de IEF. Em um gradiente de pH, sob influência de um campo elétrico, uma proteína irá se mover à posição no gradiente em que sua carga líquida é nula (seu pI). Este é o efeito focalizador da IEF, que concentra as proteínas em seus pIs e permite que sejam separadas na base de diferenças muito pequenas em carga.

A resolução é determinada pela curva do gradiente de pH no campo elétrico. A IEF é, portanto, desenvolvida a altas voltagens (acima de 1.000 V). Quando as proteínas atingem suas posições finais no gradiente de pH, existe pouquíssimo movimento de íons no sistema,

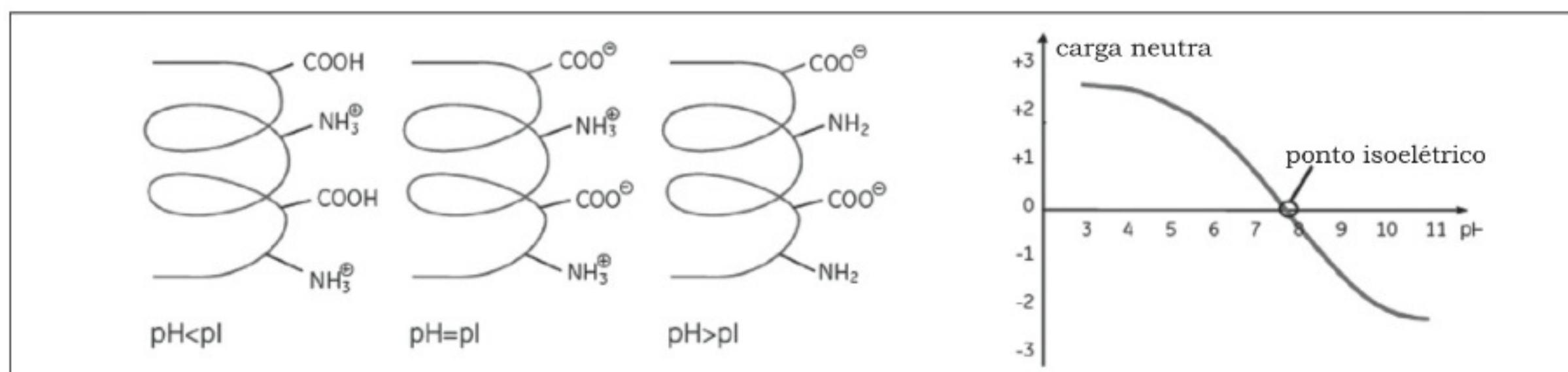


Figura 24.2 – Gráfico da carga líquida de uma proteína *versus* o pH de seu ambiente. O ponto de intersecção da curva ao eixo X representa o ponto isoelétrico da proteína.

resultando em uma corrente final muito baixa (abaixo de 1 mA). A IEF de uma dada amostra em um sistema de eletroforese é geralmente desenvolvida por um número constante de Volt-horas (sendo Volt-hora (Vh) os Volts integrais aplicados em um período de tempo).

O método original para IEF dependia de gradientes de pH gerados com anfólitos carreadores em géis de poliacrilamida feitos em tubos de vidro. Os anfólitos carreadores são moléculas anfotéricas pequenas e solúveis com alta capacidade tamponante próximo ao seu pI.

Apesar deste método básico ter sido utilizado em centenas de estudos com 2D, ele tem limitações que fizeram com que não fosse mais largamente utilizado, por alguns fatores: 1. algumas variações na manufatura dos anfólitos impedem maior reprodutibilidade na primeira dimensão; 2. os gradientes de pH formados por estes anfólitos não são muito estáveis, podendo ocorrer desvios, sobretudo em direção ao cátodo, com o tempo de focalização; e 3. os géis de poliacrilamida em tubos de vidro têm baixa estabilidade mecânica, podendo encolher ou quebrar, afetando a reprodutibilidade do método, sendo o melhor resultado dependente da experiência do operador.

A nova geração de géis com gradiente imobilizado (*immobilized pH gradient* = IPG) em formato de tiras com suporte plástico (*Immobiline DryStrips*) vieram contornar estas dificuldades, aumentando e viabilizando o uso da eletroforese bidimensional como técnica de grande utilidade exploratória.

As tiras IPG têm resistência mecânica e estabilidade no gradiente de pH, conferindo reprodutibilidade e confiança nos resultados. Elas são comercializadas secas, devendo ser reidratadas no momento do uso com a solução de reidratação que pode ou não conter a amostra solubilizada.

Devem ser reidratadas antes da IEF. A reidratação pode ser feita em bandeja específica (*Immobiline DryStrip Reswelling Tray*)(quando a focalização for feita no Multiphor II ou com o uso de Cup Loading Strip Holder no IPGphor) ou nos suportes regulares para as tiras de gel do IPGphor.

A solução de reidratação que pode conter ou não a amostra de proteína é aplicada na bandeja ou suporte de tiras que são individualmente reidratadas. As tiras reidratadas apresentam 3 mm de largura e 0,5 mm de espessura.

Por ser um gel bastante fino, o volume de amostra a ser utilizado na reidratação das tiras deve ser preciso (Tabela 24.6).

A composição típica da solução de reidratação das IPGs pode ser a seguinte:

- ureia a 8M, CHAPS a 0,5%, DTT a 0,2%, tampão IPG a 0,5% ou Pharmalyte, 0,002% de azul de bromofenol.

Proceder da Seguinte Maneira:

- a) Preparar uma solução estoque da solução de reidratação, que pode ser armazenada em alíquotas de 2,5 mL a -20°C .
- b) Imediatamente antes do uso, descongelar lentamente a alíquota da solução estoque e adicionar a quantidade apropriada de anfólitos carreadores (Tampão IPG ou Pharmalyte).
- c) Adicionar 7 mg de DTT e a amostra (se for reidratar a tira com a amostra). Ambos devem ser adicionados somente imediatamente antes do uso, para evitar degradação/oxidação.

As quantidades de amostra a serem carregadas na tira de gel para IEF também devem ser observadas cuidadosamente (Tabela 24.7).

Tabela 24.6 – Volume de solução para reidratação das tiras.

Comprimento da tira IPG (cm)	Volume total por tira (μL), incluindo a amostra
7	125
11	200
13	250
18	340
24	450

Tabela 24.7 – Quantidade de proteína a ser carregada em função do tamanho da tira de gel do tipo de coloração.

Immobiline DryStrip (pH)		Carregamento de proteína adequado (μg)	
		Coloração prata	Coloração Coomassie
7 cm	4-7	4-8	20-120
	6-11	8-16	40-240
	3-10, 3-10 NL	2-4	10-60
11 cm	4-7	10-20	50-300
	6-11	20-40	100-600
	3-10	4-8	20-120
13 cm	4-7	15-30	75-450
	6-11	30-60	150-900
	3-10, 3-10 NL	8-15	40-240
18 cm	4-7	30-60	150-900
	6-11, 6-9	60-120	300-1.500
	3-10, 3-10 NL	15-30	75-450
24 cm	4-7, 3-7	45-90	200-1.300
	6-9	80-170	400-2.000
	3-10, 3-10 NL	20-40	100-600

NL = Não Linear

A aplicação da amostra pode ser feita ao mesmo tempo que se faz a reidratação das tiras ou posteriormente. Neste último caso, as tiras são reidratadas com o tampão de reidratação e somente no momento de se iniciar a focalização as amostras são carregadas no gel,

por meio de recipientes especiais (*sample cups*). O carregamento da amostra no gel por meio dos *sample cups* requer condições mais específicas de corrida, além de suportar quantidades menores de proteína em relação à reidratação com a amostra.

A amostra a ser aplicada após a reidratação do gel deve estar no tampão de composição semelhante ao de reidratação. O ponto de aplicação da amostra vai depender das características da amostra. Se as proteínas de interesse tiverem pIs ácidos ou quando se utilizou SDS na preparação da amostra, recomenda-se aplicar próximo ao cátodo. A aplicação de amostra junto ao ânodo é necessária com gradientes de pH 6-11 e 6-9 e preferida com gradiente 3-10. A determinação empírica, no entanto, é a melhor.

Preliminares para a Focalização Isoelétrica

A focalização isoeletrica, independente do sistema, é conduzida a voltagens muito altas (3.500 a 80.000 Volts) e a correntes muito baixas (menores que 1 mA), devido à baixa força iônica que prevalece nas tiras de gel. Durante a IEF, a corrente diminui, enquanto a voltagem aumenta durante a migração das proteínas e outros componentes carregados para suas posições de equilíbrio. Em uma focalização isoeletrica típica, a voltagem é gradualmente aumentada até a voltagem de focalização final desejada, que é mantida por várias horas.

Os principais fatores que determinam o número de Volt-horas necessários à focalização de uma mistura de proteínas são o comprimento das tiras de gel e o gradiente de pH utilizado. A composição da amostra e da solução de reidratação, bem como o modo de aplicação da amostra influenciam a quantidade de Volts-hora requerida.

Conservação das Tiras Focalizadas

Após a IEF, tem-se a opção de se proceder diretamente à segunda dimensão ou armazenar as tiras em *freezer* a -70°C , em tubos tampados.

Segunda Dimensão (SDS-PAGE)

Após a focalização isoeletrica, a separação da segunda dimensão pode ser feita em vários sistemas para eletroforese, tanto horizontais quanto verticais. A técnica de SDS-PAGE consiste de quatro passos: 1. preparo do gel da segunda dimensão; 2. equilíbrio das tiras em tampão contendo SDS; 3. posicionamento da tira no gel SDS; e 4. eletroforese.

Neste capítulo, o passo de equilíbrio é descrito primeiramente, uma vez que independe do sistema a ser utilizado para o SDS-PAGE (vertical ou horizontal). Já a forma de preparo do gel, posicionamento das tiras e os protocolos para a eletroforese irão variar com a orienta-

ção do gel. O preparo do gel, no entanto, deve ser feito antes do equilíbrio das tiras se iniciar.

SDS-PAGE - Uma Revisão

SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS) é uma técnica eletroforética para a separação de polipeptídeos de acordo com seu peso molecular. A técnica é desenvolvida em géis de poliacrilamida contendo Sulfato de Sódio Dodecila (SDS). A carga elétrica intrínseca das proteínas da amostra não é um fator de separação, devido à presença de SDS na amostra e no gel. O SDS é um detergente aniônico que, quando em solução aquosa, forma micelas globulares compostas de 70-80 moléculas com a extremidade hidrocarbono duodecila no centro e os grupos sulfatos na porção hidrofílica. O SDS e as proteínas formam complexos com estrutura do tipo corrente composta por micelas de proteínas conectadas por segmentos de polipeptídeos curtos e flexíveis. O resultado desta estrutura é que grandes quantidades de SDS são incorporadas no complexo SDS-proteína na razão de aproximadamente 1,4 g de SDS por 1 g de proteína. O SDS mascara a carga da proteína e os complexos aniônicos formados apresentam uma carga negativa constante por unidade de massa. Além do SDS, um agente redutor, tal como o DTT, é também adicionado para que seja quebrada qualquer ligação -S-S- presente nas proteínas. Quando as proteínas são tratadas com SDS e um agente redutor, o grau de separação eletroforética dentro de um gel de poliacrilamida depende principalmente da massa molecular da proteína. De fato, existe uma relação aproximadamente linear entre o logaritmo do peso molecular e a distância de migração do complexo peptídeo-SDS, dependendo esta linearidade do percentual de poliacrilamida.

O sistema-tampão mais comumente utilizado para géis SDS-PAGE é o Tris-Glicina, descrito por Laemmli, 1970. Este sistema separa proteínas a um pH elevado, que confere a vantagem de se obter o mínimo de agregado entre proteínas e, portanto, uma separação clara mesmo com grandes quantidades de proteína sendo carregadas no gel. O sistema Laemmli tem a desvantagem de uma conservação relativamente curta.

Há um sistema de géis prontos que utiliza um novo sistema-tampão baseado em piperidinopropionamida (PPA), que combina maior conservação com o elevado pH de separação do sistema Laemmli.

Outros sistemas-tampão também podem ser utilizados, como o Tris-tricina de Schagger e von Jagow (1987) para a resolução de polipeptídeos na faixa de peso molecular abaixo de 10.000.

Equilíbrio das Tiras da Primeira Dimensão

O passo de equilíbrio satura a tira com o sistema-tampão requerido para a separação na segunda dimensão. A solução de equilíbrio contém tampão, ureia, glicerol, agente redutor, SDS e corante. Um passo adicional de equilíbrio substitui o agente redutor por iodoacetamida.

Componentes da Solução de Equilíbrio

A solução de equilíbrio introduz reagentes necessários para a separação na segunda dimensão. Composição: SDS a 2%, Tris-HCl a 50 mM - pH 8,8, ureia a 6 M, glicerol a 30% e azul de bromofenol a 0,002%. DTT e iodoacetamida são acrescentados de forma individual, imediatamente antes do uso.

- Tampão de equilíbrio (Tris-HCl a 50 mM, pH 8,8) mantém o pH da tira em uma faixa apropriada para a eletroforese.
 - Ureia (6 M) juntamente com o glicerol, reduz o efeito de eletroendosmose por aumentar a viscosidade do tampão. A eletroendosmose é devida à presença de cargas fixas na tira no campo elétrico e pode interferir com a transferência de proteínas da tira para o gel da segunda dimensão.
 - Glicerol (30%), juntamente com a ureia, reduz a eletroendosmose e melhora a transferência da proteína da primeira para a segunda dimensão.
 - DTT preserva o estado completamente reduzido das proteínas desnaturadas, não alquiladas.
 - SDS desnatura as proteínas e forma os complexos SDS-proteína. A quantidade de SDS ligada à proteína e, portanto, a carga negativa adicional é diretamente proporcionais à massa da proteína. Assim, a eletroforese de proteínas por meio de um gel seletivo separa as proteínas de acordo com sua massa molecular.
 - Iodoacetamida alquila os grupamentos tiois das proteínas, prevenindo sua reoxidação durante a eletroforese. A reoxidação da proteína durante a eletroforese pode resultar em arraste vertical e outros artefatos. A iodoacetamida também alquila o DTT residual, para prevenir os arrastes pontuais e outros artefatos na coloração com prata (Görg et al., 1987). A iodoacetamida é introduzida em um segundo passo de equilíbrio.
 - Corante (azul de bromofenol) é utilizado para monitorar o progresso da eletroforese.
- Os géis para segunda dimensão já devem estar prontos quando for iniciado o equilíbrio das tiras.

As tiras devem ser posicionadas em tubos e a solução acrescida de DTT (100 mg para cada 10 mL) deve ser adicionada às tiras, ficando sob agitação por 15 minutos. Para o segundo passo de equilíbrio, a primeira solução deve ser descartada e uma nova solução (desta vez acrescida de iodoacetamida 250 mg/10 mL) é adicionada à tira, para que se faça o equilíbrio por mais 15 minutos.

Após o equilíbrio, as tiras estão prontas para serem posicionadas no gel da segunda dimensão. Uma solução de agarose a 1% em tampão de corrida é utilizada para selar a tira sobre o gel vertical, para que não se mova durante a eletroforese.

Cada sistema de eletroforese para a segunda dimensão irá requerer condições específicas para o deslocamento das proteínas (ver especificação do equipamento).

Preparo de Géis SDS - Sistemas Verticais

As instruções a seguir empregam os métodos de preparação para géis de SDS-PAGE no sistema Tris-glicina de Laemmli (1970). Os géis verticais são mais convenientemente preparados quando em multiplicidade (vários géis por vez) em um molde (*caster*) para vários géis.

Algumas Considerações no Momento de se Selecionar a Porcentagem do Gel de Acrilamida

- Porcentagem única ou em gradiente: quando se utiliza um gel em gradiente, o intervalo total de separação é o mais amplo e o linear é maior. Além disso, resulta em bandas melhor definidas devido à diminuição do tamanho do poro que minimiza a difusão de proteínas. Todavia, um gel em gradiente requer mais habilidade para o preparo. Para instruções detalhadas, observar o manual do equipamento que será utilizado. Os géis de percentual único oferecem melhor resolução em determinada parte do gel (uma janela), referente a uma faixa de peso molecular específica. Um percentual comumente utilizado para eletroforese bidimensional é um gel homogêneo de 12,5% de acrilamida total. Não há necessidade de se fazer um gel de concentração (ou *stacking*) para eletroforese bidimensional.
- Quando se opta por fazer um gel homogêneo (de porcentagem única), deve-se observar a faixa de separação desejada para a escolha do percentual, conforme a tabela 24.8.

Tabela 24.8 – Concentração de acrilamida recomendada para separação de proteínas.

Sistema de separação	% Acrilamida no gel de separação	Faixa de separação ($M_r \times 10^{-3}$)
Homogêneo	5	36-200
	7,5	24-200
	10	14-200
	12,5	14-100*
	15	14-60*
Gradiente	5-15	14-200
	5-20	10-200
	10-20	10-150

*As proteínas maiores podem ter dificuldade de entrar no gel.

Preparo da Solução do Gel

O volume total de solução a ser preparado depende do tamanho e da espessura do gel, além do número de géis a ser preparado. Um minigel (placas de 10 × 10,5 cm) pode consumir de 10 a 15 mL (para 1 mm e 1,5 mm, respectivamente). Um gel do tamanho-padrão (placas de 18 × 16 cm) necessita de 30 a 45 mL de solução, dependendo da espessura e da largura dos espaçadores.

Cálculo da formulação da solução de gel – Nas tabelas 24.9 e 24.10 estão descritas as receitas para o preparo de 100 mL de solução para géis homogêneos e 50 mL de cada solução para os géis em gradiente.

Como preparar – Em um frasco tipo kitassato, preparar a solução omitindo os catalisadores TEMED e persulfato de amônio. Adicionar uma pequena barra magnética, vedar com uma rolha de borracha e aplicar o vácuo misturando em agitador magnético por alguns minutos. Adicionar os catalisadores, agitar levemente para não formar bolhas e carregar os cassetes de gel imediatamente. Os cassetes são preenchidos até 3 a 10 mm abaixo da extremidade. Uma pequena camada de água saturada com n-butanol deve ser aplicada sobre o gel para garantir que não ficará exposto ao oxigênio e com uma perfeita polimerização, com superfície reta. Aguardar cerca de 1 hora para a polimerização.

Armazenamento de géis que não serão utilizados – Quando se faz muitos géis, pode-se querer armazenar alguns deles para uma corrida posterior. Então, eles devem ser armazenados a 4°C, em recipiente fechado, imersos em uma solução Tris-Cl a 0,375M, pH 8,8, SDS a 0,1%, por alguns dias.

Antes do posicionamento das tiras sobre o gel, a solução de água saturada em n-butanol deve ser removida, a superfície lavada com água destilada e posteriormente tampão de corrida.

Visualização e Avaliação dos Resultados

Muitos dos métodos de visualização para os géis de SDS para uma dimensão podem ser aplicados aos géis 2D. As seguintes características são desejáveis:

- Alta sensibilidade.
- Larga faixa linear para quantificação.
- Compatibilidade com espectrometria de massas.
- Baixa toxicidade e seguro para o ambiente.

Todavia, nenhuma das técnicas pode contemplar todos estes requerimentos e um laboratório de 2D deve ter mais do que um dos métodos para garantir seus resultados.

Autorradiografia é um dos métodos de detecção mais sensíveis (na ordem de 200 fg de proteína). Para empregar estas técnicas, as amostras devem consistir de proteínas marcadas radiativamente *in vivo*, usando ^{35}S , ^{14}C , ^3H ou, no caso de fosfoproteínas, ^{32}P . O gel é seco e simplesmente exposto a um filme de raios X ou a um cassete.

Coloração com prata é a técnica não radiativa mais sensível (abaixo de 1 ng). A coloração com prata é complexa, com muitos passos, utilizando muitos reagentes cuja qualidade é fator crítico para uma boa coloração. Recomenda-se o uso de *kits* prontos, em que qualidade dos reagentes é elevada, fácil de utilizar e o resultado garantido.

Omitindo o glutaraldeído da solução de sensibilização e o formaldeído da solução de nitrato de prata, a técnica torna-se compatível com espectrometria de massas. Contudo, a sensibilidade é reduzida.

Coloração com Coomassie – apesar de cerca de 50 a 100 vezes menos sensível que a coloração com prata, é um método relativamente simples e mais quantitativo do que a coloração com prata. O Coomassie *blue* é preferido quando as quantidades relativas de proteínas devem ser determinadas por densitometria. O método de coloração

Tabela 24.9 – Receitas para o preparo de géis homogêneos.

Concentração final do gel	5%	7,5%	10%	12,5%	15%
Solução acrilamida:bis (30:0,8)	16,7 mL	25 mL	33,3 mL	41,7 mL	50 mL
Tris-HCl a 1,5 M, pH 8,8	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL
SDS a 10%	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Água ultrapura	56,8 mL	48,5 mL	40,2 mL	31,8 mL	23,5 mL
Persulfato de amônio a 10%	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
TEMED	33 µL	33 µL	33 µL	33 µL	33 µL
Volume total	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL

Tabela 24.10 – Receitas para o preparo de géis em gradiente.

Solução “leve”, concentração final	5%	7,5%	10%	12,5%	15%
Solução acrilamida:bis (30:0,8)	8,4 mL	12,5 mL	16,5 mL	21,0 mL	25 mL
Tris-HCl a 1,5 M pH 8,8	12,5 mL	12,5 mL	12,5 mL	12,5 mL	12,5 mL
SDS a 10%	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
Água ultrapura	28,5 mL	24,5 mL	20,0 mL	16,0 mL	12,0 mL
Persulfato de amônio a 10%	170 µL	170 µL	170 µL	170 µL	170 µL
TEMED	17 µL	17 µL	17 µL	17 µL	17 µL
Volume total	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL
Solução “pesada”, concentração final	10%	12,5%	15%	17,5%	20%
Solução acrilamida:bis (30:0,8)	16,7 mL	21 mL	25 mL	29,2 mL	33,3 mL
Tris-HCl a 1,5 M pH 8,8	12,5 mL	12,5 mL	12,5 mL	12,5 mL	12,5 mL
SDS a 10%	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
Água ultrapura	16,2 mL	11,7 mL	7,7 mL	3,5 mL	0 mL
Persulfato de amônio a 10%	165 µL	165 µL	165 µL	165 µL	165 µL
TEMED	16,5 µL	16,5 µL	16,5 µL	16,5 µL	17 µL
Volume total	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL

coloidal é recomendado porque mostra maior sensibilidade (na ordem de 100 ng de proteína por *spot*).

A coloração negativa Zinco-Imidazol tem um limite de detecção na ordem de aproximadamente 15 ng proteína/*spot* e é bem compatível com a espectrometria de massas, mas é uma técnica não adequada à quantificação.

Análise da Proteína no *Spot*

Coleta de *Spots* (*Picking*)

Para as análises subsequentes, os *spots* de interesse ou todos (dependendo da aplicação da técnica) devem

ser coletados, descoloridos e tratados para que seja feita a identificação das proteínas. Este procedimento pode ser feito manualmente (no caso de poucos *spots* e géis coloridos) ou de forma robotizada, para a coleta de muitos *spots* ou sua coleta a partir de géis com coloração fluorescente.

O Ettan Spot Picker™ é um sistema robotizado para coletar automaticamente os *spots* selecionados a partir de uma lista gerada por meio da análise da imagem do gel e transferi-los para microplacas, nas quais terão os tratamentos futuros.

Os géis prontos em suporte plástico (Ettan DALT™ gel ou ExcelGel™) ou preparados no labora-

tório em suporte plástico ou em vidro são corados com Coomassie, prata ou corantes fluorescentes (CyDyes™) com duas marcas de referência visíveis coladas em cada gel. Os géis são escaneados utilizando o ImageScanner II™ ou o Typhoon™ e analisados utilizando os *softwares* ImageMaster 2D Platinum™ ou DeCyder™. As posições dos *spots* selecionados são exportadas como uma lista de coleta ao Ettan Spot Picker™. Os géis são colocados no instrumento sob líquido, e a câmera detecta as marcas de referência. O *software* de controle converte as coordenadas do *spot* em coordenadas de coleta e o Ettan Spot Picker™ seleciona e transfere os *plugs* de gel em microplacas de 96 escavações.

Digestão das Proteínas

Para que sejam analisadas e identificadas, as proteínas devem ser digeridas com enzima específica, de forma a gerar um padrão de peptídeos para ser comparado ou inserido aos bancos de dados. Os *plugs* e géis são submetidos à descoloração, secagem e posterior tratamento com a enzima (geralmente uma tripsina que não seja autodigerível). Dessa forma, ocorre a digestão da proteína dentro do *plug* de gel. Os peptídeos que deixam a malha do gel estão agora presentes no sobrenadante e prontos para serem analisados.

O procedimento para a digestão de *spots* requer muitas etapas de lavagem, secagem e trocas de soluções e tempo de incubação que, manualmente, tornam o processo inviável quando se trata de um grande número de amostras.

O procedimento de manuseio de *spots* pode ser feito completamente automatizado com a Ettan Spot Handling Workstation™ ou semiautomatizado, utilizando a transferência manual das microplacas entre os equipamentos.

Uma vez que os peptídeos foram isolados, faz-se a mistura com a matriz de ácido cinâmico ou sináptico para análise em espectrômetro de massa por ionização a laser assistida por matriz (MALDI – Ionização/dessorção a laser assistida por matriz). Esta fase da análise será abordada em detalhes no Capítulo 27.

Referências

- Ames, G.F.-L.; Nikaido, K. Two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins. *Biochemistry* 15:616-623, 1976.
- Barret, A.J.; Salversen, G. *Proteinase Inhibitors*, Amsterdam: Elsevier Press, 1986.
- Bjellqvist, B.; Ek, K.; Righetti, P.G.; Gianazza, E.; Görg, A.; Westermeier, R.; Postel, W. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 6:317-339, 1982.
- Blomberg, A.; Blomberg, L.; Norbeck, J.; Fey, S.J.; Larsen, P.M.; Larsen, M.; Roepstorff, P.; Degand, H.; Boutry, M.; Posch, A.; Görg, A. Interlaboratory reproducibility of yeast protein patterns analyzed by immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 16:1935-1945, 1995.
- Bollag, D.M.; Edelman, S.J. Protein Methods. Chapter 2: *Protein Extraction*. New York: Wiley-Liss, 1991.
- Colas des Francs, C.; Thiellement, H.; de Vienne, D. Analysis of leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.*, 78:178-182, 1985.
- Cremer, F.; Van de Walle, C. Method for extraction of proteins from green plant tissues for twodimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 147:22-26, 1985.
- Cull, M.; McHenry C.S. Preparation of extracts from prokaryotes. *Methods Enzymol*, 182:147-153, 1990.
- Damerval, C.; de Vienne, D.; Zivy, M.; Thiellement, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, 7:52-54, 1986.
- Deutscher, M.P. ed. Guide to protein purification. *Methods Enzymol*, 182:1-894, 1990.
- Dignam, J.D. Preparation of extracts from higher eukaryotes. *Methods Enzymol.*, 182:194-203, 1990.
- Dunn, M.J.; Corbett, J.M. 2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods Enzymol*, 271:177-203, 1996.
- Englard, S.; Seifter, S. Precipitation techniques. *Methods Enzymol.*, 182:285-300, 1990.
- Flengsrud, R.; Kobro, G. A method for two-dimensional electrophoresis of proteins from green plant tissues. *Anal. Biochem.*, 177:33-36, 1989.
- Geigenheimer, P. Preparation of extracts from plants. *Methods Enzymol.*, 182:174-193, 1990.
- Görg, A.; Postel, W.; Günther, S.; Weser, J. Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on transfer to the second dimension. *Electrophoresis*, 6:599-604, 1985.
- Görg, A.; Postel, W.; Weser, J.; Günther, S.; Strahler, J.R.; Hanash, S.M.; Somerlot, L. Elimination of point streaking on silver stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer. *Electrophoresis*, 8:122-124, 1987.
- Görg, A.; Postel, W.; Günther, S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 9: 531-546, 1988.
- Görg, A.; Postel, W.; Domschke, A.; Günther, S. Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gra-

- dients of leaf proteins from barley (*Hordeum vulgare*): method, reproducibility and genetic aspects. *Electrophoresis* 9:681-692, 1988.
- Görg, A.; Boguth, G.; Obermaier, C.; Posch, A.; Weiss, W. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis*, 16:1079-1086, 1995.
- Görg, A.; Obermaier, C.; Boguth, G.; Csordas, A.; Diaz, J.J.; Madjar, J.J. Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins. *Electrophoresis*, 18:328-337, 1997.
- Granier, F. Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 9:712-718, 1988.
- Guy, G.R.; Philip, R.; Tan, Y.H. Analysis of cellular phosphoproteins by two-dimensional gel electrophoresis: applications for cell signaling in normal and cancer cells. *Electrophoresis*, 15:417-440, 1994.
- Halloway, P.; Arundel, P. High-resolution two-dimensional electrophoresis of plant proteins. *Anal. Biochem.*, 172:8-15, 1988.
- Hurkman, W.J.; Tanaka, C.K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by twodimensional gel electrophoresis. *Plant. Physiol.*, 81:802-806, 1986.
- Jazwinski, S.M. Preparation of extracts from yeast. *Methods Enzymol.*, 182:154-174, 1990.
- Kawaguchi, S.-I.; Kuramitsu, S. Separation of heat-stable proteins from *Thermus thermophilus* HB8 by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 16:1060-1066, 1995.
- Klose, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutation in mammals. *Human-genetik*, 26:231-243, 1975.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685, 1970.
- Lenstra, J.A.; Bloemendal, H. Topography of the total protein population from cultured cells upon fractionation by chemical extractions. *Eur. J. Biochem.*, 135:413-423, 1983.
- Matsui, N.M.; Smith, D.M.; Clauser, K.R.; Fichmann, J.; Andrews, L.E.; Sullivan, C.M.; Burlingame, A.L.; Epstein, L.B. Immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometric identification of cytokine-regulated proteins in ME-180 cervical carcinoma cells. *Electrophoresis*, 18:409-417, 1997.
- Molloy, M.P.; Herbert, B.R.; Walsh, B.J.; Tyler, M.I.; Traini, M.; Sanchez, J.C.; Hochstrasser, D.F.; Williams, K.L.; Gooley, A.A. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 19:837-844, 1998.
- Musante, L.; Candiano, G.; Ghiggeri, G.M. Resolution of fibronectin and other uncharacterized proteins by two-dimensional polyacrylamide electrophoresis with thiourea. *J. Chromat.*, 705:351-356, 1997.
- North, M.J. Prevention of unwanted proteolysis. In: Beynon, R.J.; Bond, J.S., eds. *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford: p.105-124, 1989.
- O'Farrell, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250:4007-4021, 1975.
- Pasquali, C.; Fialka, I.; Huber, L.A. Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins. *Electrophoresis*, 18:2573-2581, 1997.
- Pennington, S.R.; Wilkins, M.R.; Hochstrasser, D.F.; Dunn, M.J. Proteome analysis: from protein characterization to biological function. *Trends Cell Biol.* 7: 168-173, 1997.
- Portig, I.; Pankuweit, S.; Lottspeich, F.; Maisch, B. Identification of stress proteins in endothelial cells. *Electrophoresis*, 17:803-808, 1996.
- Posch, A.; Van den Berg, B.M.; Burg, H.C.J.; Görg, A. Genetic variability of carrot seed proteins analyzed by one- and two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 16:1312-1316, 1995.
- Rabilloud, T. Solubilization of proteins for electrophoretic analysis. *Electrophoresis*, 17:813-829, 1996.
- Rabilloud, T. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 19:758-760, 1998.
- Rabilloud, T.; Adessi, C.; Giraudel, A.; Lunardi, J. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 18:307-316, 1997.
- Ramsby, M.L.; Makowski, G.S.; and Khairallah, E.A. Differential detergent fractionation of isolated hepatocytes: Biochemical, immunochemical and two-dimensional gel electrophoresis characterization of cytoskeletal and noncytoskeletal compartments. *Electrophoresis*, 15:265-277, 1994.
- Salvesen, G.; Nagase, H. Inhibition of proteolytic enzymes. In: Beynon, R.J.; Bond, J.S. eds. *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*. Oxford: IRL Press, p.83-104, 1989.
- Sanchez, J.-C.; Appel, R.D.; Golaz, O.; Pasquali, C.; Ravier, F.; Bairoch, A.; Hochstrasser, D.F. Inside SWISS-2DPAGE database. *Electrophoresis*, 16:1131-1151, 1995.
- Schägger, H.; von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, 166:368-379, 1987.
- Scopes, R.K. Protein purification: principles and practice, *Chapter 2: Making an Extract*. 2nd ed., Springer Verlag, New York: 1987.

- Taylor, R.S.; Wu, C.C.; Hays, L.G.; Eng, J.K.; Yates, J.R.I.; Howell, K.E. Proteomics of rat liver Golgi complex: minor proteins are identified through sequential fractionation. *Electrophoresis*, 21:3441-3459, 2000.
- Teixeira-Gomes, A.P.; Cloeckert, A.; Bezard, G.; Dubray, G.; Zygmunt, M.S. Mapping and identification of *Brucella melitensis* proteins by two-dimensional electrophoresis and microsequencing. *Electrophoresis*, 18:156-162, 1997.
- Theillet, C.; Delpeyroux, F.; Fiszman, M.; Reigner, P.; Esnault, R. Influence of the excision shock on the protein metabolism of *Vicia faba* L. meristematic root cells. *Planta*, 155:478-485, 1982.
- Toda, T.; Ishijima, Y.; Matsushita, H.; Yoshida, M.; Kimura, N. Detection of thymopoietinresponsive proteins in nude mouse spleen cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and image processing. *Electrophoresis*, 15:984-987, 1994.
- Tsugita, A.; Kamo, M.; Kawakami, T.; Ohki, Y. Two-dimensional electrophoresis of plant proteins and standardization of gel patterns. *Electrophoresis*, 17:855-865, 1996.
- Usuda, H.; Shimogawara, K. Phosphate deficiency in maize. VI. Changes in the two-dimensional electrophoretic patterns of soluble proteins from second leaf blades associated with induced senescence. *Plant Cell Physiol.*, 36:1149-1155, 1995.
- Wilkins, M.R.; Pasquali, C.; Appel, R.D.; Ou, K.; Golaz, O.; Sanchez, J.C.; Yan, J.X.; Gooley, A.A.; Hughes, G.; Humphrey-Smith, I.; Williams, K.L.; Hochstrasser, D.F. From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *BioTechnology*, 14:61-65, 1996.
- Wolpert, T.J.; Dunkle, L.D. Alternations in gene expression in sorghum induced by the hostspecific toxin from *Periconia circinata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:6576-6580, 1983.

25. Análise de Expressão de Proteínas Celulares Usando Técnica de Citometria de Fluxo

Claudia Costa Accorsi Pardi

Introdução

A citometria de fluxo é uma técnica que permite a caracterização e análise de partículas em suspensão, com base em múltiplos parâmetros físicos, enquanto a amostra passa em um fluido por uma fonte de luz.

O equipamento empregado nesta técnica é o citômetro de fluxo, que converte luz em valores digitais quantificados por meio da aplicação de vários processos físicos, conforme será explicado em detalhes posteriormente. Basicamente, o citômetro de fluxo tem três sistemas que se integram: fluídico, óptico e eletrônico.

A citometria tem sido utilizada como ferramenta para os mais diversos campos de ciências biológicas e biomédicas, tais como análise de células, protozoários, microesferas e cromossomos.

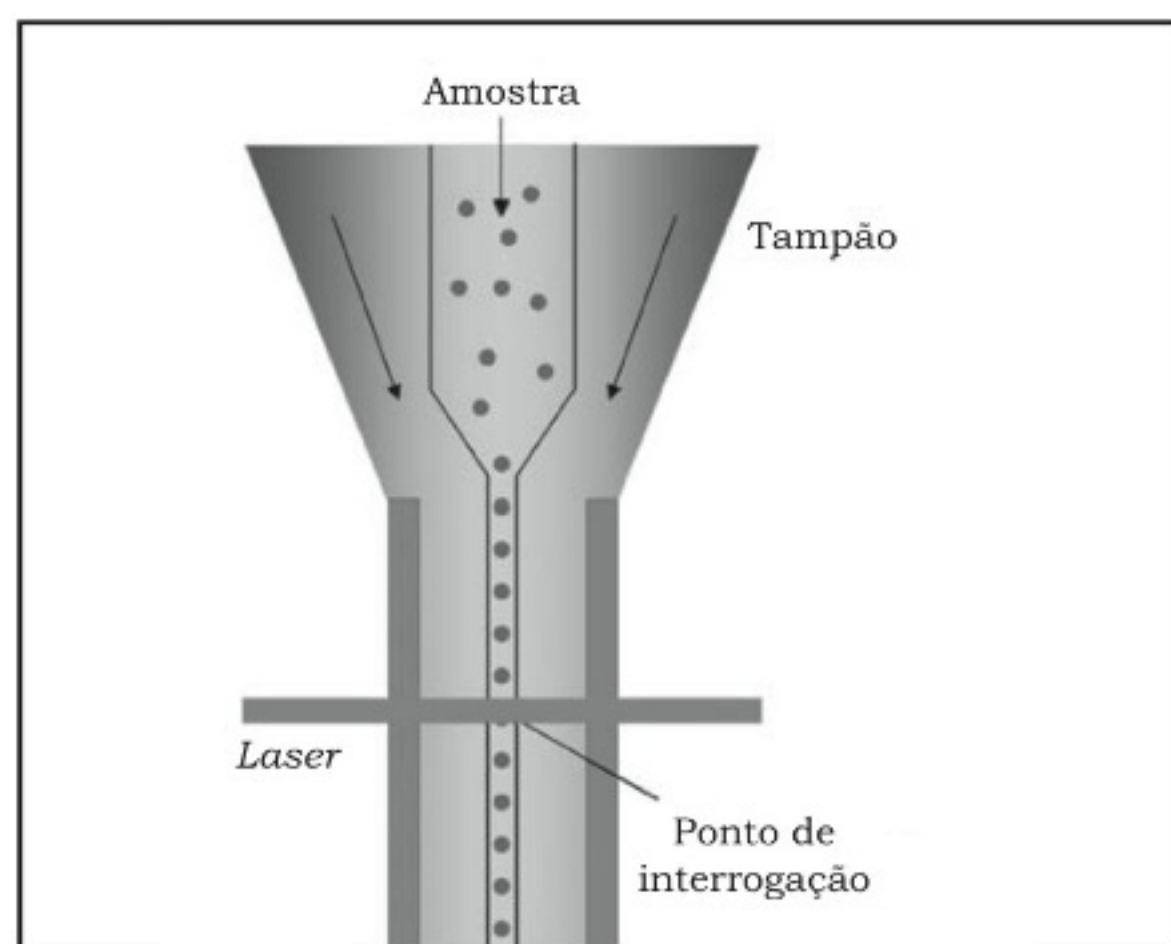


Figura 25.1 - Esquema do foco hidrodinâmico do citômetro de fluxo BDFACSSAria™. Passagem da amostra pelo ponto de interrogação na célula de fluxo. Adaptado de http://www.bdbiosciences.com/immucytometry_systems/support/training/online/ITF

A técnica de citometria de fluxo permite a análise de tamanho e granulosidade ou complexidade interna de células ou partículas, bem como intensidade de fluorescência.

Os sistemas fluídicos, ópticos e eletrônicos interagem para gerar as informações sobre as partículas a serem estudadas.

Sistema Fluídico

O ponto principal da citometria de fluxo é a análise de partículas em fluxo, em uma fileira única passando por uma fonte de luz.

Isto é realizado por um processo físico chamado foco hidrodinâmico, que fornece um sistema exato e reprodutível, de modo que cada partícula seja medida individualmente em orientação adequada, enquanto passa através de um feixe de luz focalizado. É dentro da célula de fluxo que a amostra e a solução-tampão (FACSFLOW) se encontram. A amostra é injetada no centro do fluxo do tampão, formando o foco hidrodinâmico. O desenho da célula de fluxo permite a formação do foco hidrodinâmico e também a passagem uma a uma das partículas pelo laser no ponto de interrogação (Fig. 25.1).

A figura 25.2 ilustra o caminho percorrido pela amostra e pelo tampão, que gera o fluido.

Sistema Óptico

O sistema óptico gera e coleta os sinais de luz, nos quais um conjunto de filtros, lentes e fotomultiplicadores interagem. A luz utilizada nos citômetros de fluxo é o laser (*light amplification by stimulated emission of radiation*). Esta fonte de luz é monocromática, unidirecional e em fase.

Existe pelo menos uma fonte de laser no equipamento, que emite luz na direção do fluxo de partículas; esta

luz atravessa a corrente de líquido (fluido), onde estão as partículas, que podem ou não emitir fluorescência. A luz que incide sobre as partículas é dispersa e coletada por detectores de luz frontal (FSC) e lateral (SSC).

O detector FSC detecta a luz difratada e gera dados relativos à área da superfície celular. Este parâmetro é detectado ao longo do eixo de incidência da luz, na direção frontal (Fig. 25.3).

A luz refletida ou refratada lateralmente e detectada pelo detector de luz lateral SSC permite a investigação da complexidade interna e granularidade da célula. A fluorescência emitida também a 90° da emissão do *laser* e é direcionada pelo sistema óptico, até chegar aos fotomultiplicadores (PMT).

Os fluorocromos são moléculas que absorvem a luz emitida pelo feixe de luz (*laser*), são excitados em comprimentos de onda específicos e emitem luz em um comprimento de onda mais longo do que o de excitação.

O equipamento é configurado para aproveitar o máximo possível desta fluorescência. Com um jogo de filtros e espelhos, o sinal resultante da interação *laser*/partícula é direcionado para detectores ópticos.

Diversos tipos de filtros são utilizados nos citômetros BD. Os filtros de passagem longa (*longpass* – LP) permitem a passagem de luz maior ou igual ao comprimento de onda específico; os filtros de passagem curta (*shortpass* – SP) permitem a passagem de luz menor ou igual ao comprimento de onda específico; existem ainda os filtros de passagem de banda (*bandpass* – BP), que permitem a passagem de uma faixa de comprimento de onda específica (Fig. 25.4).

Em conjunto com diversos espelhos, os filtros ajudam a direcionar a fluorescência para os diversos fotomultiplicadores (PMT) que receberão os sinais de comprimentos de onda específicos de cada fluorescência (FL1, FL2, FL3, FL4) (Fig. 25.5).

O arranjo dos detectores dos citômetros BD atuais foi modificado de forma a minimizar a perda de sinal (Fig. 25.6).

Os fótons emitidos são captados pelo sistema de detecção que gera um pulso elétrico proporcional à intensidade de luz emitida por cada célula. Por fim, os sinais ópticos são convertidos em sinais eletrônicos proporcionais e digitalizados para análise por computador.

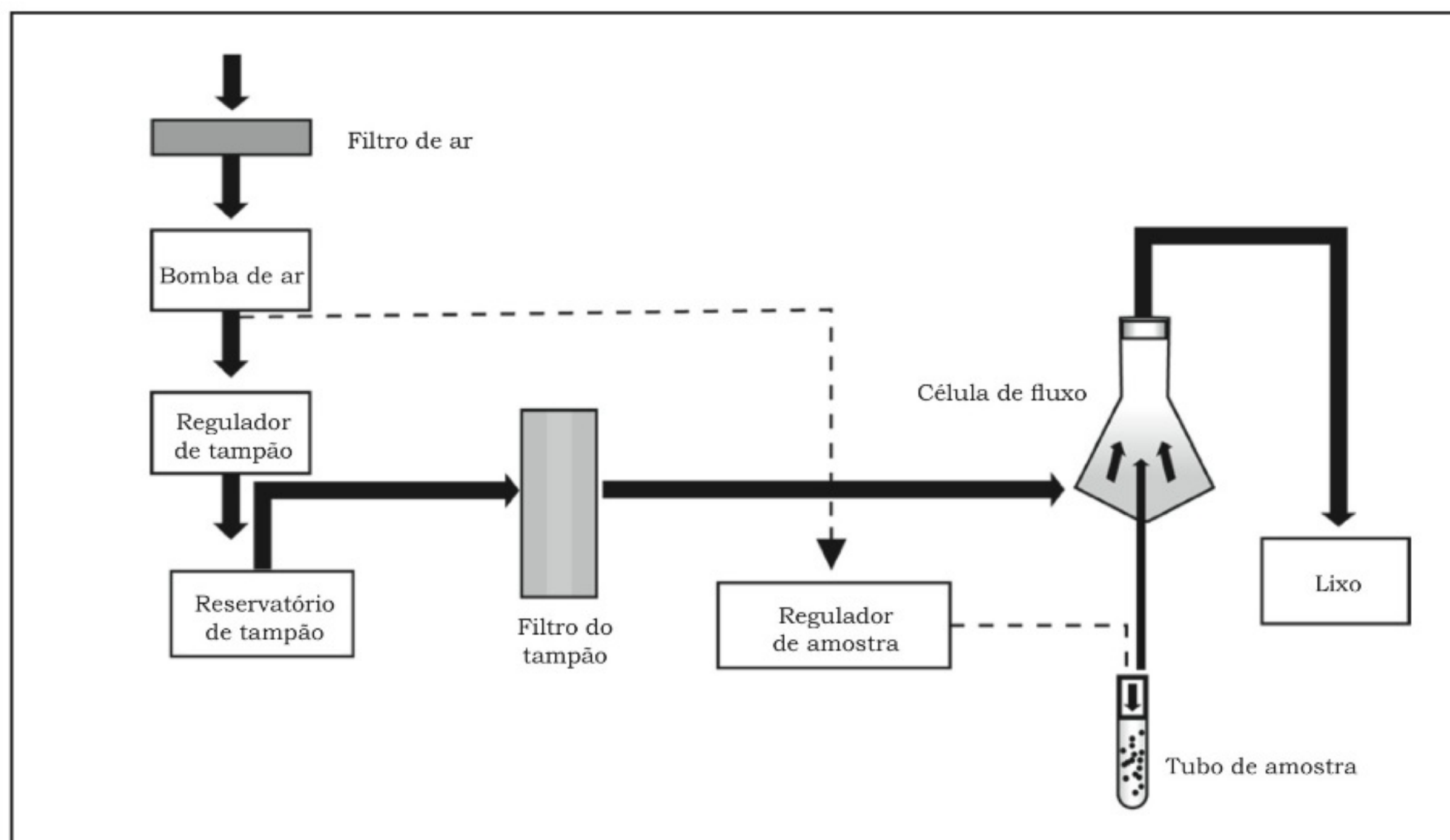


Figura 25.2 - Esquema ilustrativo do sistema fluídico de um citômetro de fluxo Becton Dickinson (BD).

Sistema Eletrônico

Os sinais ópticos são convertidos em sinais eletrônicos proporcionais, que são os pulsos de voltagem.

O pulso de voltagem é construído com a passagem da luz pela partícula em fluxo, gerando gráficos de voltagem \times tempo. Um pulso é provocado quando a borda de uma célula cruza primeiramente o feixe de *laser*. Quando a célula está inteiramente no trajeto do *laser*, o sinal máximo é produzido. Assim que a célula sai do feixe de *laser*, a amplitude do pulso gerado declina. Todos os pulsos são avaliações momento a momento

da passagem de uma célula ou de uma partícula através do feixe de *laser* (Fig. 25.7).

Para cada parâmetro a ser medido, é construído um pulso de voltagem (Fig. 25.8).

Os pulsos podem ser medidos de várias maneiras. A altura de um pulso representa o sinal máximo de uma célula quando esta atravessa o feixe de *laser*. A medida da área do pulso é um parâmetro que representa a intensidade de fluorescência por extensão de tempo com mais detalhes que a análise simples do pico de fluorescência requerida por um objeto para passar através do feixe de *laser* (Fig. 25.9).

Análise de Dados

Os sinais eletrônicos de voltagem são então convertidos em números. A Sociedade Internacional de Citologia Analítica criou um formato de conversão de dados que é utilizado para a geração de dados na citometria de fluxo. Este formato é o FCS (*Flow Cytometry Standard*).

Os dados são gerados em forma de lista para o computador, que armazena as informações de cada partícula. Estes dados podem ser visualizados em diferentes formatos gráficos. O formato de disposição de pontos (*dot-plot*) permite a comparação de dois parâmetros (Fig. 25.10).

Outro tipo de representação é o gráfico de histograma, que permite a visualização de número de eventos relacionados a um simples parâmetro. O eixo horizontal re-

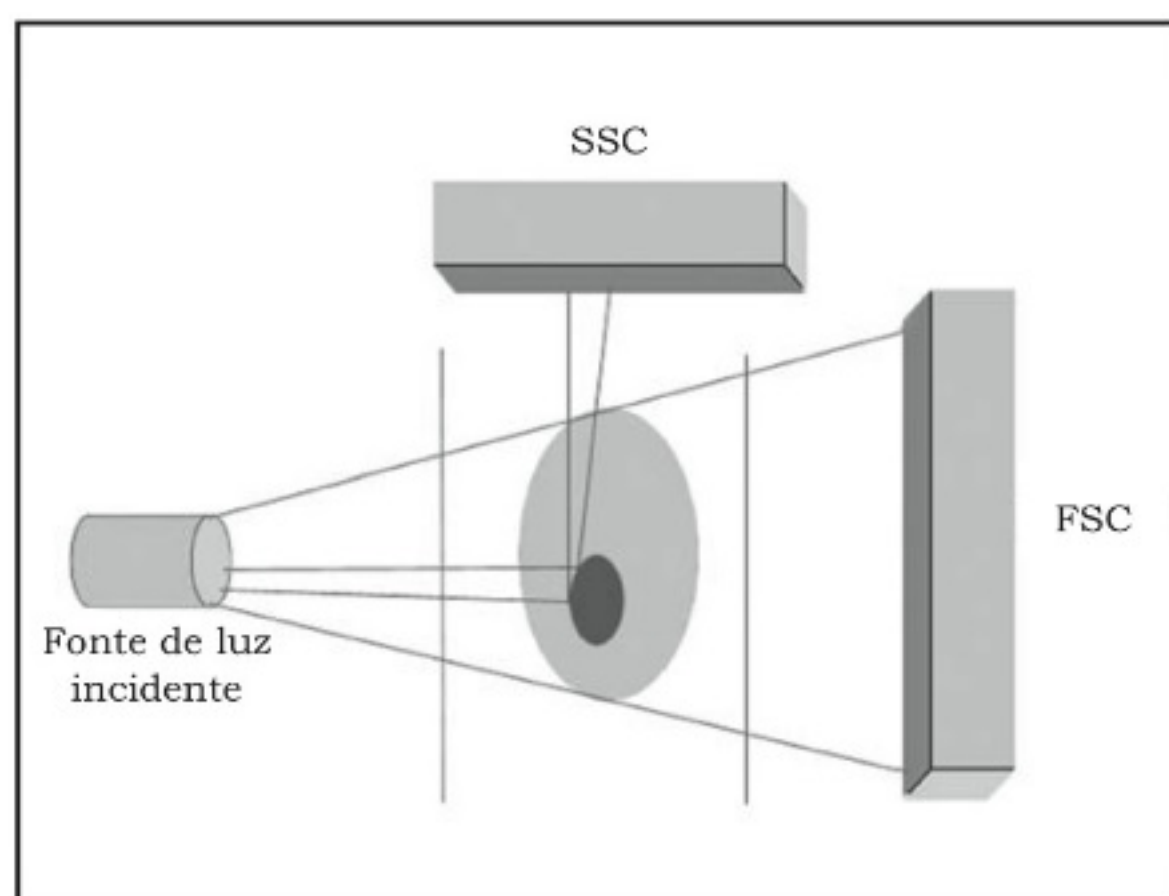


Figura 25.3 - Esquema da incidência do *laser* sobre a partícula em fluxo. Parte da luz é detectada em FSC e parte em SSC.

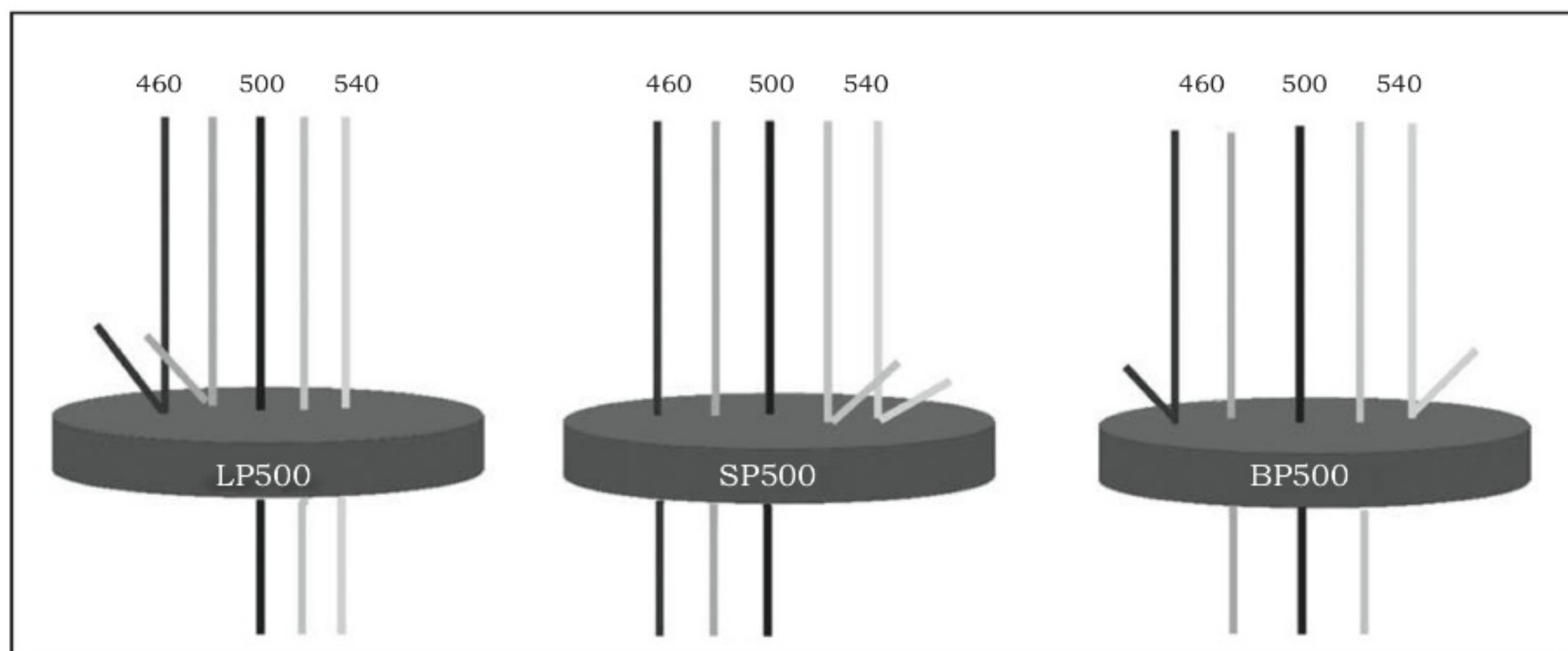


Figura 25.4 - Esquema ilustrativo dos tipos de filtros que compõem o sistema óptico de um citômetro de fluxo. Filtros de passagem longa (LP), passagem curta (SP) e passagem de banda (BP).

presenta a intensidade crescente do sinal do parâmetro e o eixo vertical representa o número de eventos (Fig. 25.11).

Regiões

A delimitação de região (*gate*) é uma metodologia que pode ser utilizada para a análise de subpopulações (Fig. 25.12).

O *software* de citometria gera dados referentes ao número de eventos contados, porcentagem de partículas de cada região delimitada, média, média geométrica, desvio-padrão. Todos estes dados em conjunto levam aos resultados da análise. Caso haja necessidade de contagem absoluta de número de células, podem-se usar partículas de referência juntamente com a amostra e obter o número absoluto por correlação.

Marcação de Partículas

As variações no tamanho e na complexidade interna permitem a classificação dos diferentes tipos celulares, permitindo diferenciar, por exemplo, populações de linfócitos, monócitos e neutrófilos, sem nenhuma fluorescência (Fig. 25.12). Em conjunto com estas informações, podem-se gerar dados de marcação de fluorescência das partículas. Na imunofenotipagem, por exemplo, as células são marcadas para a identificação de populações celulares por seus marcadores de superfície (são os chamados CDs, de *Cluster of Differentiation*). Neste procedimento, são utilizados anticorpos monoclonais específicos, conjugados a fluorocromos (Fig. 25.13).

Os anticorpos são proteínas que reagem especificamente com moléculas conhecidas como antígenos. Cada molécula de anticorpo tem uma estrutura única que possibilita reagir com um antígeno específico, embora todos os anticorpos tenham mesma estrutura global, que define a classe das imunoglobulinas.

Os anticorpos monoclonais são os mais utilizados na técnica de citometria, por apresentarem mais especificidade ao antígeno. São moléculas produzidas por um único clone de linfócitos B, geralmente elaborados de células híbridas produtoras de anticorpos, pela fusão de células de mieloma com células esplênicas imunes. Tais anticorpos são conjugados aos fluorocromos para uso da técnica de citometria de fluxo.

Os fluorocromos apresentam diferentes características de absorção e emissão de luz, permitindo assim que mais de um fluorocromo excitado ou não por uma mesma fonte de luz possa ser usado simultaneamente.

Por exemplo, os fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC), R-ficoeritrina (R-PE), R-Ficoeritrina cianina 5 (Pe-Cy5) e proteína perinidina clorofil (Complexo Proteína Peridinaclorofil PerCP) podem ser utilizados no FACSCalibur com um único *laser* de íon argônio que emite luz em 488 nm, para a realização de uma análise de até três cores simultaneamente. Esta mesma fonte de luz é suficiente para excitar os três fluorocromos, que emitirão luz em três diferentes comprimentos de onda.

Com a adição de uma segunda fonte de *laser* helio-neônio (He-NE), que emite luz em 633 nm, é possível analisar quatro parâmetros de fluorescência além de FSC e SSC. Neste caso, os anticorpos monoclonais são conjugados a fluorocromos como alofococianina (APC) e *Texas Red* por exemplo.

Hoje, a Becton Dickinson (BD) disponibiliza equipamentos capazes de medir até 15 parâmetros simultaneamente (BD FACSAria).

No quadro 25.1 são descritos alguns dos fluorocromos mais utilizados e suas respectivas faixas de excitação e emissão.

Mais de um fluorocromo pode ser utilizado simultaneamente na citometria de fluxo. Embora os fluorocromos, quando excitados, emitam luz em comprimentos de onda diferentes, pode haver a sobreposição dos espectros (Fig. 25.14).

A sobreposição de cores deve ser compensada, de modo a resolver a interferência de um fluorocromo sem outro, seja fazendo ajustes no equipamento, seja via *software*.

Separação Celular (*Sorting*)

Alguns citômetros são equipados também com ferramentas para a separação de populações celulares e não somente análise. As partículas podem ser separadas até uma a uma (clonagem).

A separação em citômetros pode ser mecânica ou por carga. Hoje, a velocidade de separação é muito maior (turbo *sorting*). Além disso, podem-se separar até quatro populações simultaneamente.

Um dos critérios mais utilizados para a separação é o fenótipo celular. Basicamente a técnica consiste na marcação de superfície das células de interesse, análise por citometria de fluxo e seleção da região onde elas se encontram (gráfico *dot-plot*), e separação das células de interesse. Assim que a célula passa pelo *laser*, a parte eletrônica do citômetro decide

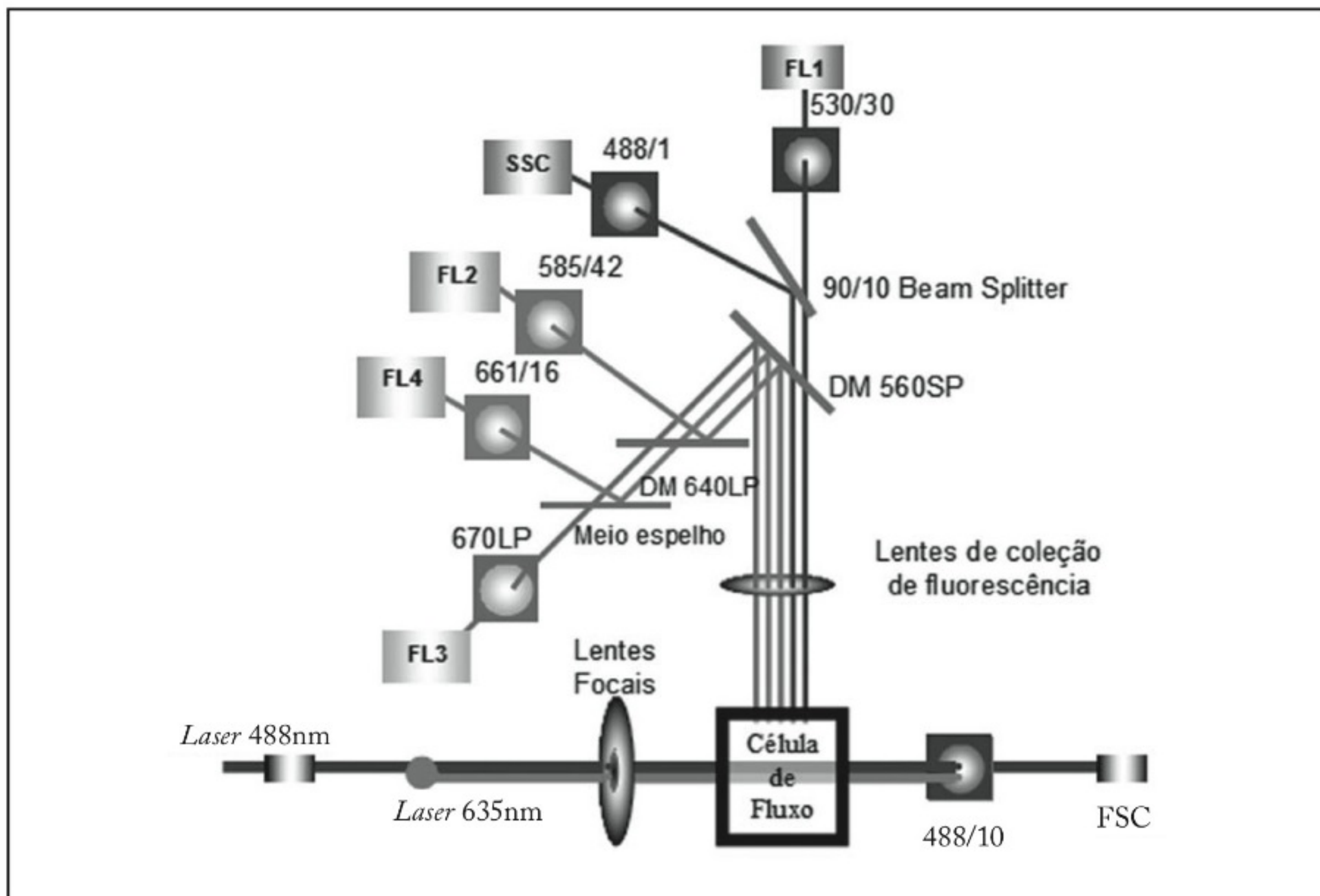


Figura 25.5 – Esquema do sistema óptico do citômetro de fluxo BD FACSCalibur™. Adaptado de: <http://www.bdbiosciences.com/immunocytometry-systems/support/training/online/ITF>.

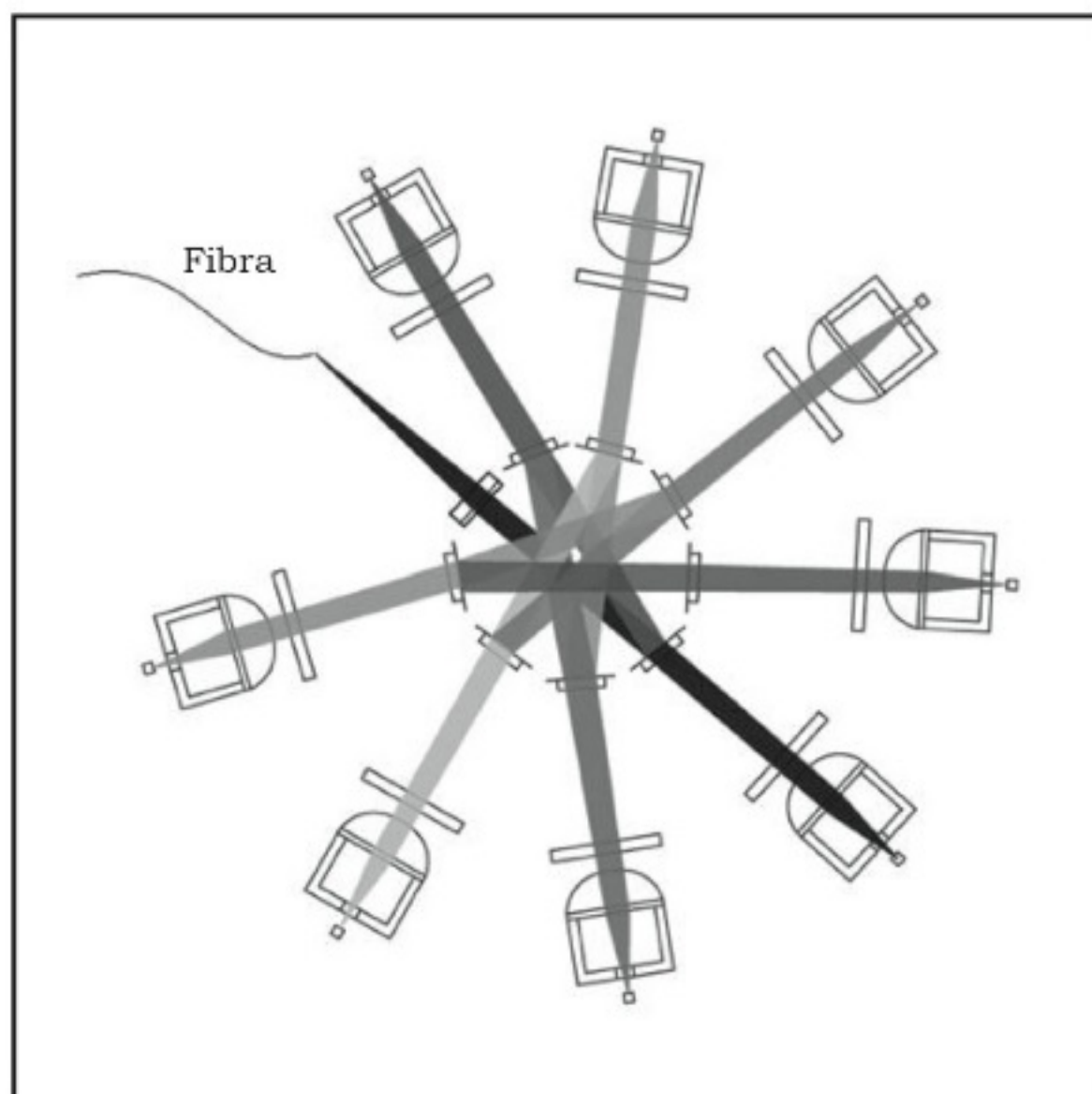


Figura 25.6 – Esquema do arranjo octogonal dos detectores dos citômetros BD FACSAria™. Adaptado de: literatura Bd Biosciences 23-9640-00.

rapidamente se esta é uma célula-alvo, baseada nas características da região selecionada. Uma vez decidido, a captura é realizada e a célula é enviada para o tubo de coleta.

Aplicações

A citometria de fluxo é empregada nos mais diversos tipos de aplicação:

Aplicações em Laboratórios Clínicos

- Imunofenotipagem de células CD3/CD4/CD8 de pacientes HIV-positivos.
- Contagem absoluta de células CD⁴⁺.
- Imunofenotipagem de leucemias e linfomas.
- Análise de ciclo celular e ploidia em tumores.
- Enumeração de reticulócitos.
- Crossmatching (transplantes).

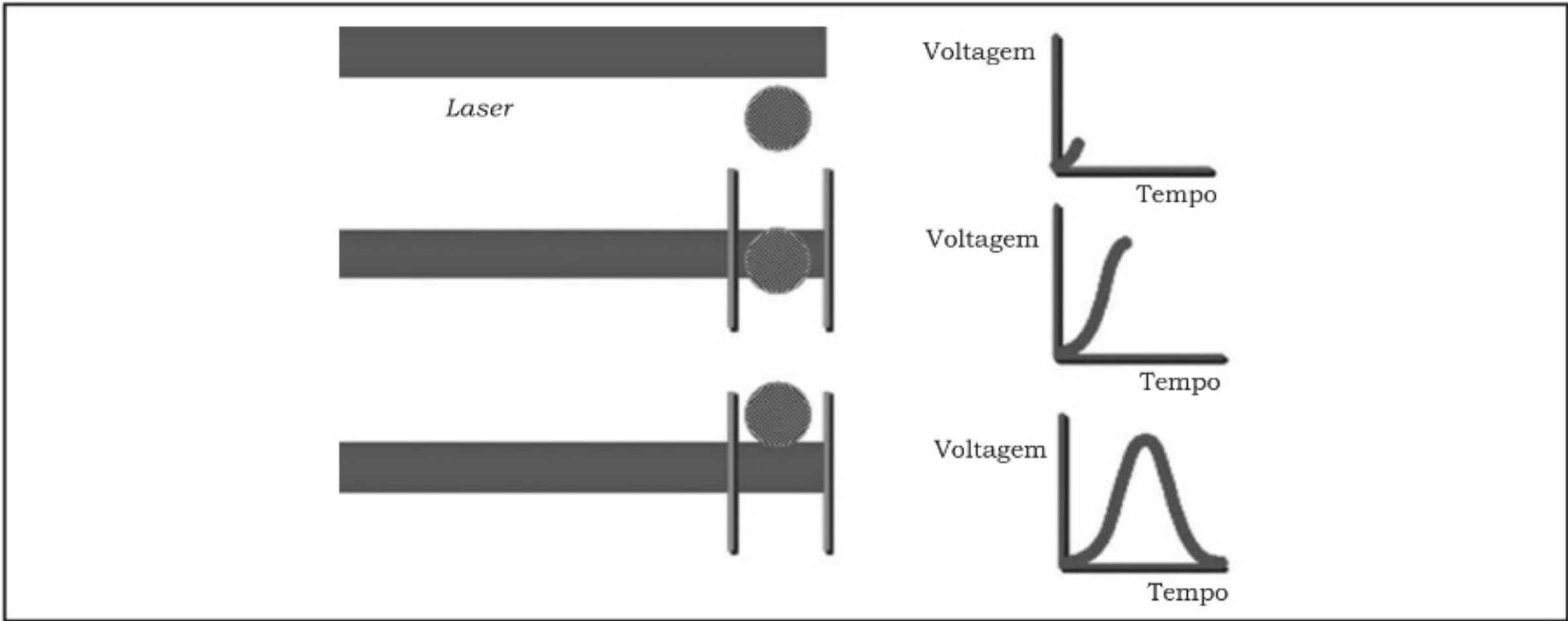


Figura 25.7 – Esquema da construção do pulso de voltagem.

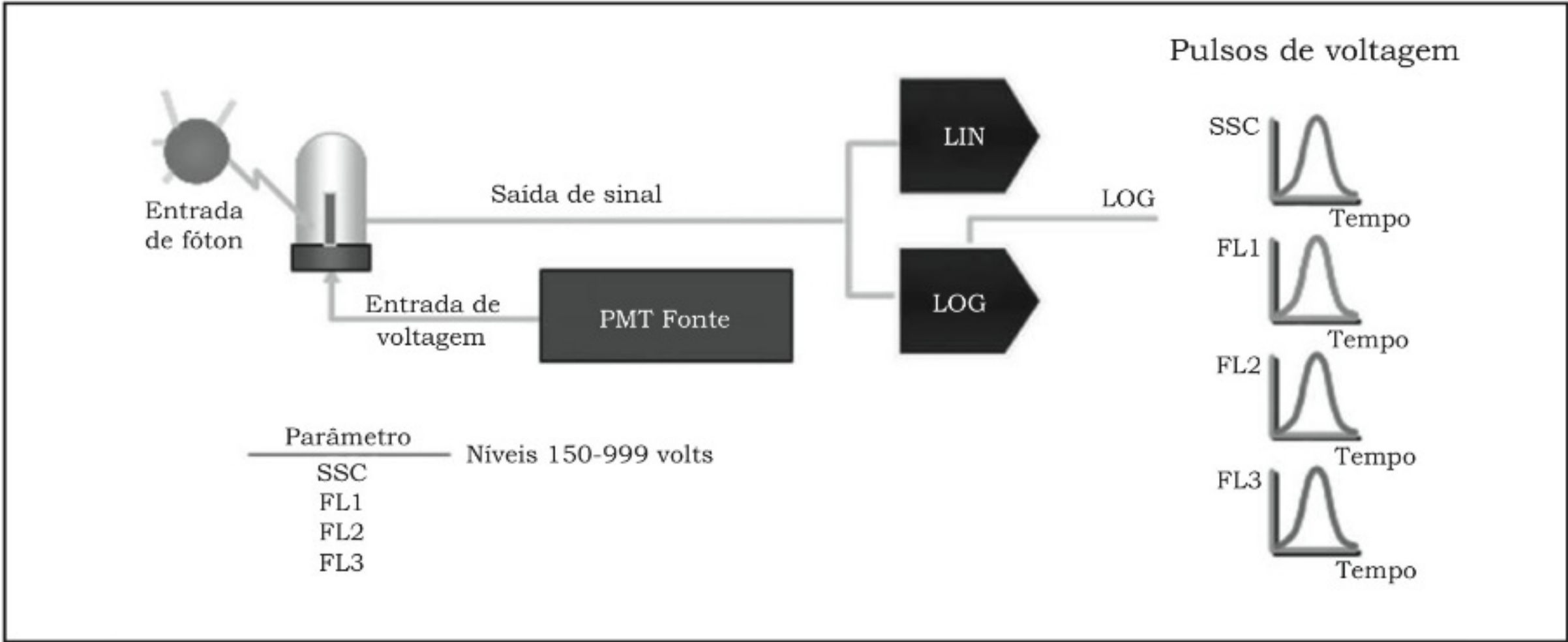


Figura 25.8 – Esquema de conversão de sinal óptico em eletrônico.

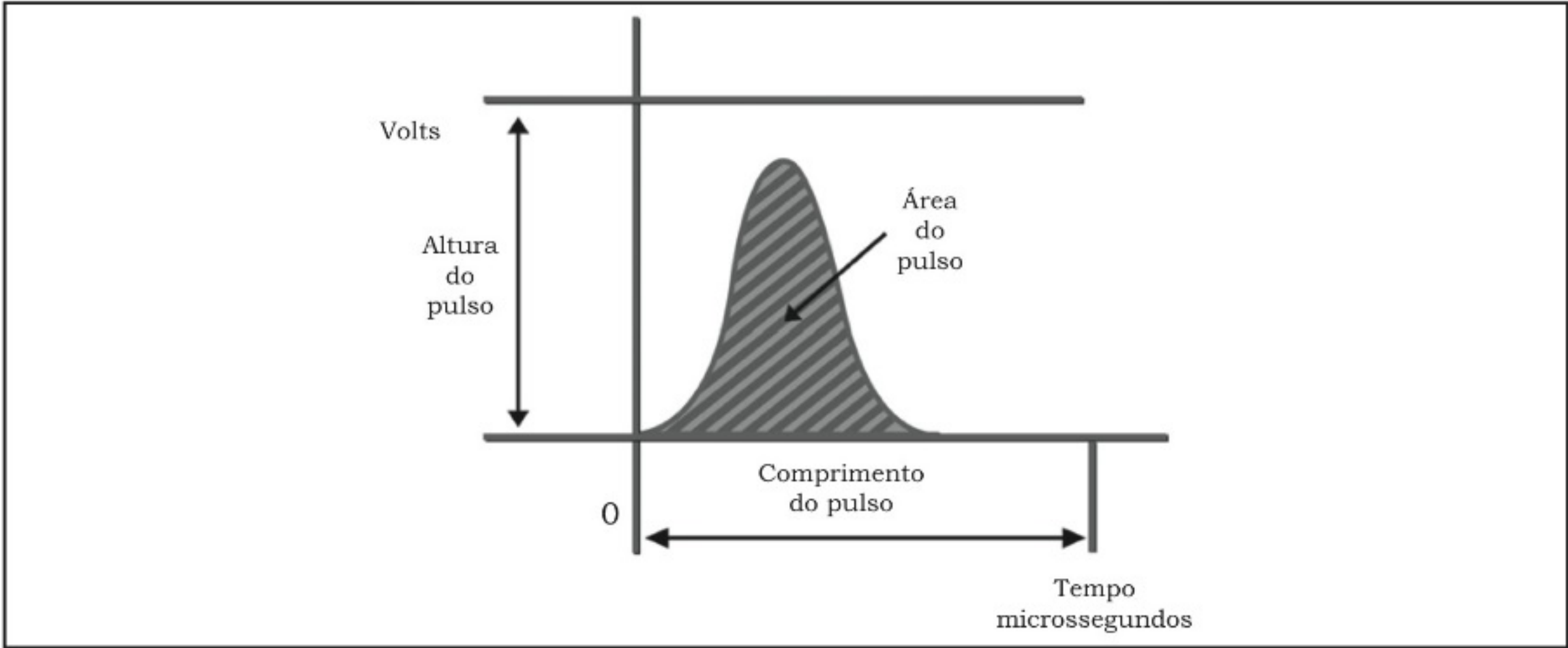


Figura 25.9 – Quantificação do pulso de voltagem.

- Enumeração de células-tronco.
- Detecção de células sanguíneas residuais.
- Sexagem de espermatozoides.
- Separação de cromossomos.

Aplicações em Pesquisa

- Quantificação de expressão de moléculas na superfície celular.
- Estudos de células-tronco.
- Estudos de resistência a drogas.
- Estudos de cinética celular.
- Análise de plaquetas.
- Análise de microrganismos (bactérias, parasitas).
- Estudos de ciclo celular.
- Análise de morte celular e apoptose.
- Estudo de proteínas fosforiladas.
- Análise de plâncton.
- Determinação e qualificação de proliferação celular.
- Quantificação de infecções por parasitas intracelulares.
- Detecção de proteínas solúveis com o uso de microesferas.

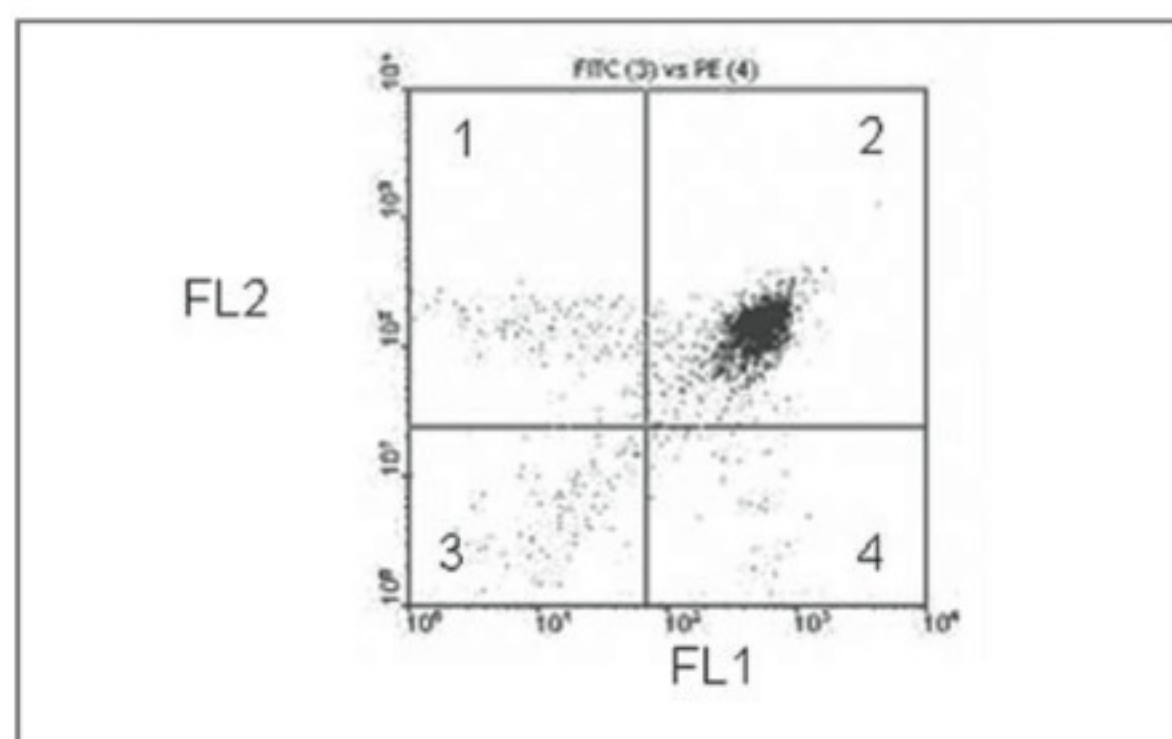


Figura 25.10 – Representação gráfica de populações celulares em forma de pontos (*dot-plot*). Cada ponto corresponde a um evento. O gráfico é dividido em quatro quadrantes, com base nos resultados do controle isotópico (controle negativo): superior esquerdo (1), populações positivas para a fluorescência (FL2) (normalmente PE) e negativas para a fluorescência 2 (FL1) (normalmente FITC); superior direito (2), populações duplo-positivas, positivas para FL1 e FL2; inferior esquerdo (3), populações negativas para ambas as fluorescências; inferior direito (4), populações positivas para FL1 e negativas para FL2.

- Determinação da frequência de células produtoras de citocinas, via marcação intracitoplasmática.

Ensaio para Detecção de Proteínas Intracelulares

O ensaio de detecção de proteínas intracelulares por citometria de fluxo consiste na sua marcação dentro das células para posterior análise. Utilizaremos como exemplo a detecção de citocinas.

Primeiramente, as células são estimuladas *in vitro*, para a reativação da célula.

As células ativadas apresentam um aumento do retículo endoplasmático e da secreção de citocinas pelo complexo de Golgi. Para que estas citocinas produzidas não sejam secretadas antes da análise, são utilizadas proteínas inibidoras de transporte e secreção, como monensina e brefeldina A.

O próximo passo é a marcação da superfície celular com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos, para posterior distinção da célula produtora de citocinas.

Já com a superfície marcada, as células são agora fixadas com paraformaldeído, permeabilizadas e marcadas com anticorpos monoclonais citocina-específicos.

Depois de marcadas, as células são submetidas à análise por citometria de fluxo.

Protocolos

Marcação fluorescente de leucócitos de rato ou camundongo:

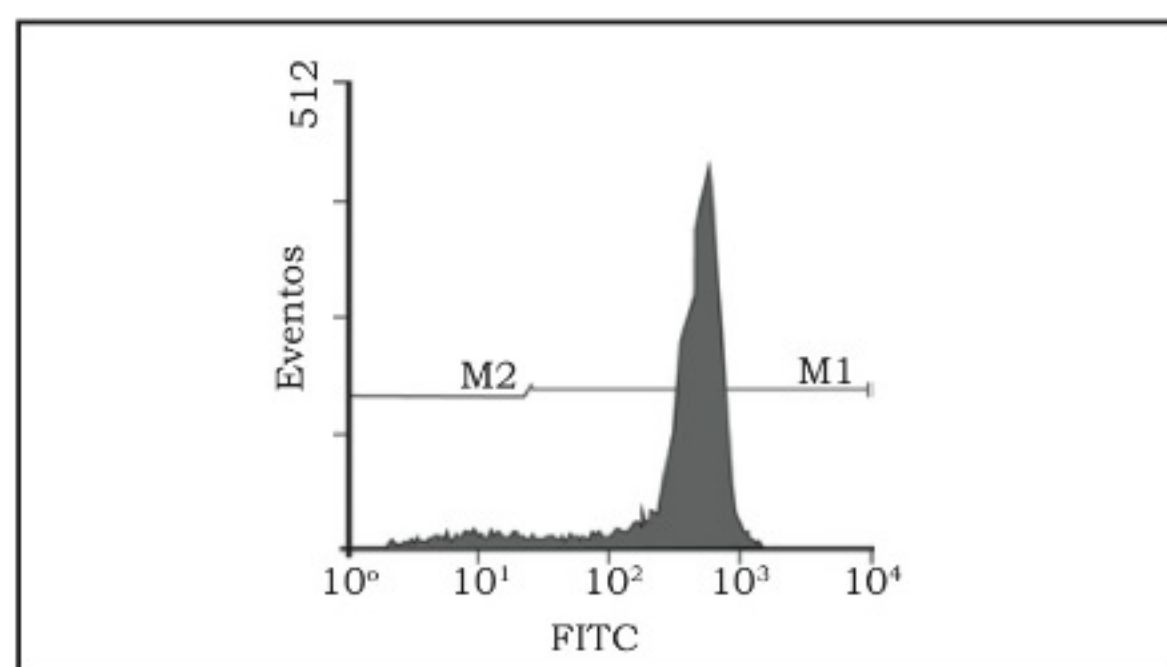


Figura 25.11 – Gráfico do tipo histograma; número de eventos (eixo y) × fluorescência FITC (eixo x).

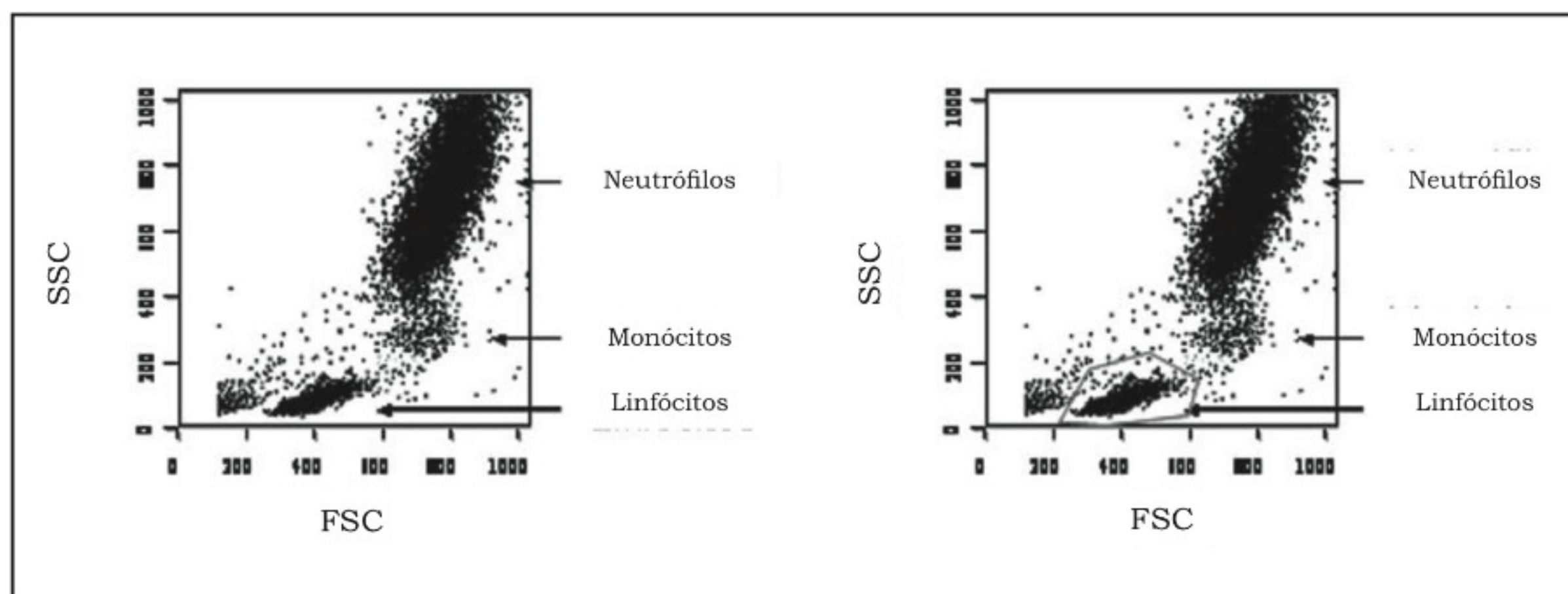


Figura 25.12 – Gráficos *dot-plot* de população de células sanguíneas; esquema de delimitação de região (*gate*) na população de linfócitos. Dados de parâmetros de tamanho (FSC) e granulocidade (SSC).

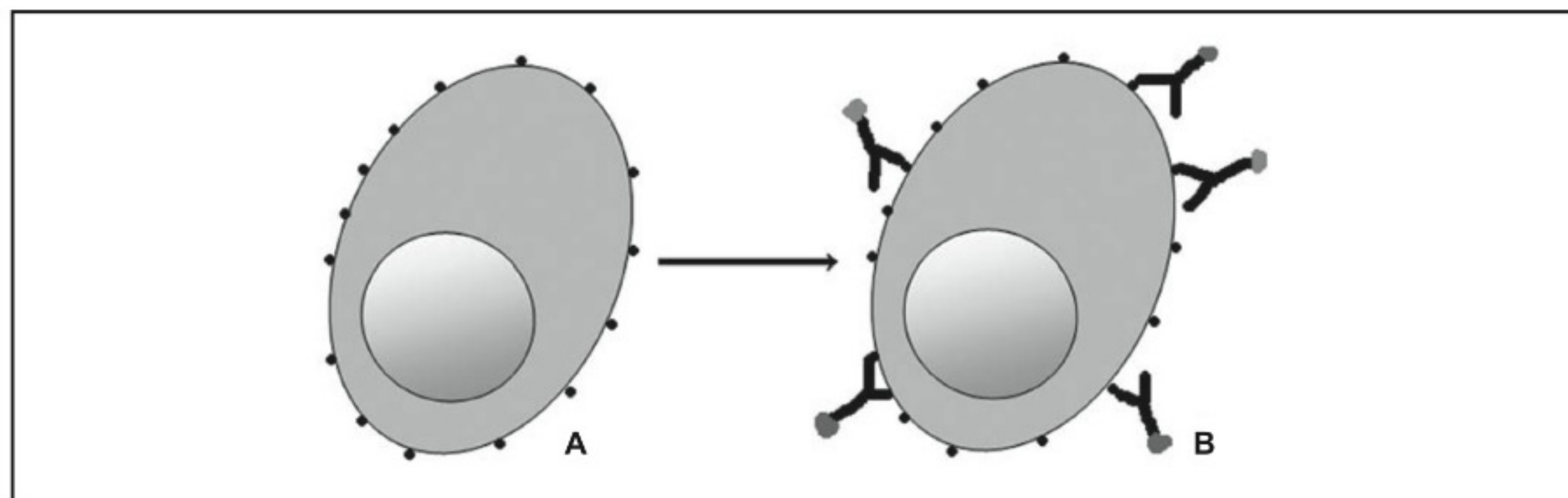


Figura 25.13 – (A) Esquema de célula com moléculas na superfície. (B) Esquema de célula marcada com anticorpo conjugado a fluorocromo (complexo anticorpo – CD).

- Coletar células de tecido preparando uma suspensão celular. Células sanguíneas vermelhas podem ser removidas por lise ou gradiente de densidade.
- Após a coleta, lavar as células em tampão de lavagem (PBS contendo 1% de NaN_3 e 1% de soro fetal bovino) e ressuspender o sedimento para uma concentração de 2×10^7 células/mL ($10^6/50 \mu\text{L}$).
- Diluir os anticorpos primários (não marcados, biotinilados ou conjugados a fluorocromos) em tampão de lavagem, na concentração determinada (ver em sugestão para a marcação de uma população celular), e distribuir em uma microplaca de fundo em U, em volume de $50 \mu\text{L}$.
- Distribuir 10^6 células ($50 \mu\text{L}$) em cada orifício da placa que já contém $50 \mu\text{L}$ de anticorpo (ou $50 \mu\text{L}$ de tampão para controles negativos).
- Misturar gentilmente no vórtice.
- Incubar a 4°C por 20-40 minutos no escuro.
- Lavar $2 \times$ com $200 \mu\text{L}$ de tampão de lavagem (ou $3 \times$ se o anticorpo primário for biotinilado). Depois de cada centrifugação, $350 \times g$ por 5 minutos, aspirar as células ou vire a placa rapidamente. Desprender o sedimento antes de adicionar o próximo tampão ou reagente secundário.

Quadro 25.1- Fluorocromos e fontes de excitação/emissão.

Fluorocromo	Ex (nm)	Em (nm)	Fluorocromo	Ex (nm)	Em (nm)
Reativos e conjugados			Alexa Fluor (Sondas Moleculares)		
R-Ficoeritrina	480, 565	578	Alexa Fluor 350	346	445
Conjugados - PE-Cy5	480, 565, 650	670	Alexa Fluor 430	430	545
Conjugados-PE-Cy7	480, 565, 743	767	Alexa Fluor 488	494	517
Conjugados-APC-Cy7	650, 755	767	Alexa Fluor 532	530	555
Red 613	480, 565	613	Alexa Fluor 546	556	573
Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)	495	519	Alexa Fluor 555	556	573
PerCP	490	675	Alexa Fluor 568	578	603
Vermelho Texas (sulforodamina 101)	589	615	Alexa Fluor 594	590	617
Alofocianina (APC)	650	660	Alexa Fluor 633	621	639
Cy (AP Biotech)			Alexa Fluor 647	650	668
Cy2	489	506	Alexa Fluor 660	663	690
Cy3	(512)/550	570; (615)	Alexa Fluor 680	679	702
Cy3.5	581	596; (640)	Alexa Fluor 700	696	719
Cy5	(625)/650	670	Alexa Fluor 750	752	779
Cy5.5	675	694			
Cy7	743	767	Ácidos Nucleicos		
Proteínas Fluorescentes			Hoechst 33342	343	483
Y66F	360	508	DAPI	345	455
Y66H	360	442	Hoechst 33258	345	478
EBFP	380	440	SYTOX Blue	431	480
Tipo selvagem para microorganismos Genotipo comum para humanos	396, 475	508	Cromomicina A3	445	575
GFPuv	385	508	Mitramicina	445	575
ECFP	434	477	YOYO-1	491	509
AmCyan1	458	489	Verde SYTOX	504	523
Y66W	436	485	Laranja SYTOX	547	570
S65A	471	504	Brometo de Etídio	493	620
S65C	479	507	7-AAD	546	647
S65L	484	510	Laranja Acridina	503	530,640
S65T	488	511	TOTO-1, TO-PRO-1	509	533
EGFP	489	508	Laranja Tiazol	510	530
ZsGreen1	493	505	Iodeto de propídio (PI)	536	617
EYFP	514	527	TOTO-3, TO-PRO-3	642	661
ZsYellow1	527	539	LDS 751	543,590	712,607
DsRed, DsRed2 (RFP)	558	583	Função Celular		
Vermelho Ds-monomero <i>red fluorescent protein from Discosoma sp</i>	556	586	Indo-1	361/330	490/405
AsRed2	576	592	Fluo-3	506	526
mRFP1	584	607	DCFH	505	535
HcRed1	588	618	DHR	505	534
Outros			SNARF	548/579	587/635
Monoclorobimane	380	461			
Calceína	496	517			

Adaptado de: <http://flowcyt.salk.edu/fluor.html>

Legenda: Ex: Comprimento de onda do pico de excitação (nm); Em: Comprimento de onda do pico de emissão (nm).

- Caso seja usado um segundo anticorpo, ressuspender o sedimento em 100 μ L do reagente secundário (avidina-fluorocromo, estreptavidina etc.). Por exemplo, diluir o anticorpo para ~ 1 μ g por 100 μ L em tampão de lavagem e adicionar em cada orifício ressuspensão.
- Incubar a 4°C por 20-40 minutos no escuro.
- Lavar 2 \times com 200 μ L de tampão de lavagem. Usar 100 μ L de tampão de lavagem para ressuspender o sedimento e transferir para tubos apropriados para leitura no citômetro contendo 400 μ L de tampão de lavagem. A concentração final para a leitura deverá ser de $10^6/500$ μ L. Analisar as células em um citômetro assim que possível.
- Caso não seja possível analisar as células no final da marcação, adicionar solução PBS com 2% de formaldeído em cada tubo, agitar e manter por até 36 horas à temperatura de 2-8°C.
- Desprezar o sobrenadante contendo plaquetas.
- Ressuspender as PBMC RPMI completo (RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino (FCS), 100U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina, 1 mM de piruvato, 0,05 mM de 2-mercaptoetanol, 2 mM L-glutamina).
- Lavar 2 \times neste meio (centrifugar 6' a 800 rpm).
- Contar a suspensão celular com azul Trypan para determinação de viabilidade.
- Utilizar suspensões celulares que apresentaram viabilidade $\geq 95\%$.
- Neste momento, as células podem ser congeladas em solução de RPMI completo contendo 20% de DMSO (criopreservante) e mantidas a -80°C, para utilização posterior nos ensaios de citometria de fluxo (FACS). O congelamento das células deverá ser gradual, envolvendo os tubos de congelamento em estantes de isopor para levar ao freezer -80°C.

Protocolo para a Marcação de Citocinas Intracitoplasmáticas

A metodologia descrita neste protocolo faz o uso de células mononucleadas de sangue periférico (PBMC).

Purificação de Células Mononucleadas de Sangue Periférico (PBMC)

- Coletar amostras de sangue por punção intravenosa, em tubos Vacutainer contendo heparina.
- Em condições de esterilidade, separar o plasma das células por centrifugação 10'/800 g/TA.
- Ressuspender as células em tampão HBSS na proporção 1:1 (partindo-se de 10 mL de sangue, obtêm-se 20 mL final de amostra diluída).
- Montar o gradiente de densidade (densidade 1,077 g/mL): em um tubo cônico de 50 mL, aplicar delicadamente/suavemente a suspensão celular sobre o gradiente de densidade, sem deixar que se misturem, 7 mL de Ficoll para cada 20 mL de amostra diluída.
- Centrifugar por 30'/900 g/TA.
- Recuperar as PBMCs (células mononucleares de sangue periférico), com o auxílio de uma pipeta.
- Ressuspender as células recuperadas em 40 mL de HBSS.
- Centrifugar 6' a 800 rpm.

Descongelamento das PBMC

- Descongelar as PBMC rapidamente em banho a 37°C.
- Retirar a suspensão celular do tubo de congelamento e transferir para um tubo cônico de 15 mL, com uma pipeta sorológica previamente embebida em FCS (para impedir a aderência de células à parede da pipeta).
- Adicionar 2 mL de PBS gelado gota a gota sobre a suspensão celular.
- Fazer um "colchão" de FCS de 1,5 mL sob as células.
- Centrifugar por 5' a 1.200 rpm.
- Lavar as células em PBS (centrifugar por 5' a 1.200 rpm).
- Contar com azul Trypan para a determinação de viabilidade.

Estimulação com Anti-CD3/Anti-CD28

- Utilizar anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD28 para estimulação das PBMC previamente ativadas e recém-descongeladas, para posterior ensaio de marcação intracelular.
- Aplicar as PBMC na concentração de 2×10^6 /poço, diluídas em 2 mL de meio RPMI completo, contendo os anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD28, nas concentrações de 2 μ g/mL e 1 μ g/mL, respectivamente, em placas de 24 poços.
- Incubar as células a 37°C em CO₂ a 5% por 7h.

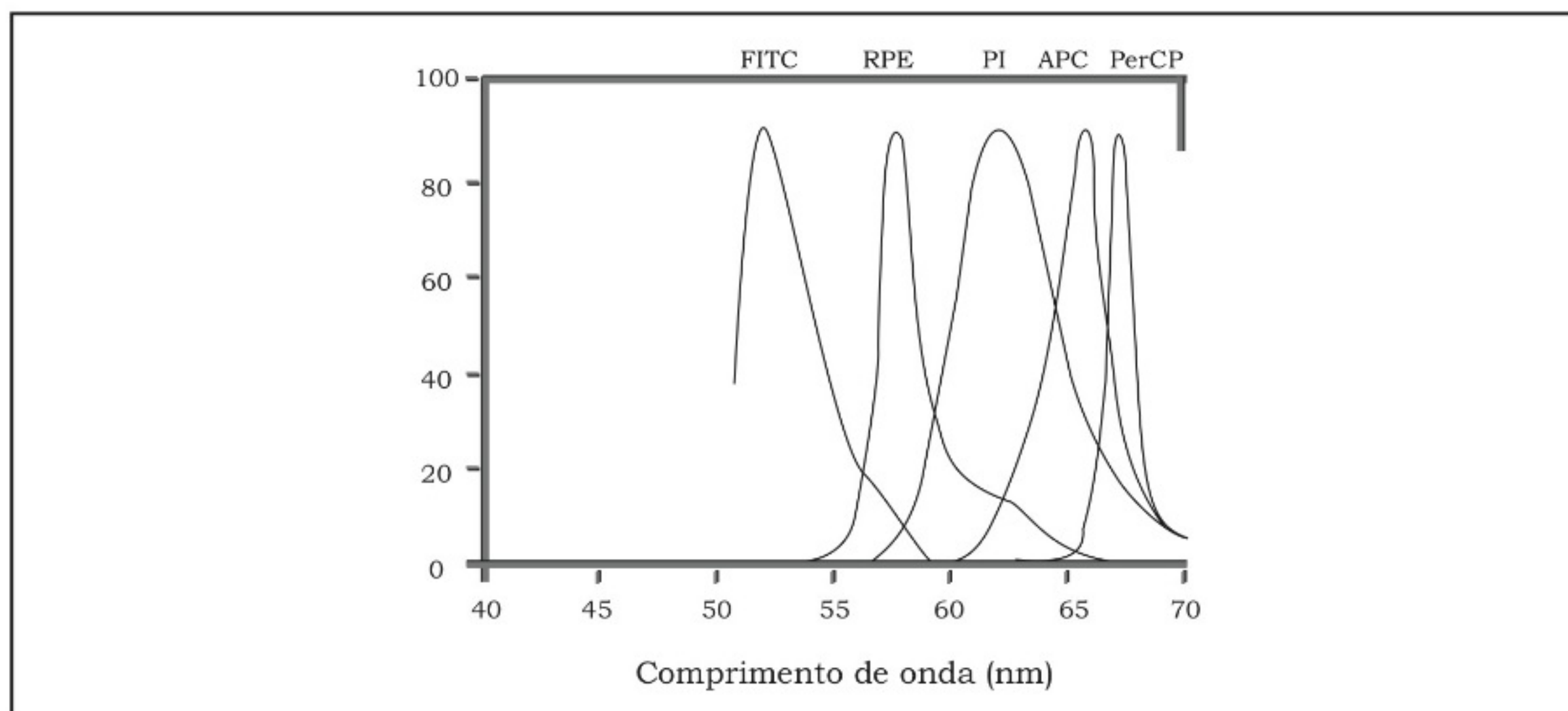


Figura 25.14 – Espectro de emissão dos fluorocromos FITC, PE, PI, APC e PERCP.

Marcação de Superfície e Intracitoplasmática

- Adicionar 20 μ L/poço de brefeldina A (inibidor de transporte de proteínas recém-sintetizadas), na concentração de 1 mg/mL, e a incubar por mais 4 horas a 37°C em CO₂ a 5%.
- Coletar as células da placa com PBS gelado e centrifugar por 10', 1.200 rpm, a 4°C
- Ressuspender em 250 μ L de PBS e plaquear em placa de 96 orifícios com fundo em U, 25 μ L/poço.
- Adicionar anticorpos para a marcação de superfície (normalmente, marca-se a superfície celular para identificação e distinção de populações celulares secretoras de citocinas), em quantidade de 25 μ L/poço (exemplo, anti-CD4 FITC), em diluição ótima para o uso, determinada anteriormente, diluídos em PBS contendo 0,25% de BSA e 1 mM de azida sódica (Fig. 25.13).
- Incubar a placa por 15' a 4°C.
- Adicionar 150 μ L de PBS gelado e centrifugar a placa por 5', 1.200 rpm, a 4°C. No caso de marcação indireta (biotina/estreptoavidina), é necessária mais uma incubação, com estreptoavidina, seguida de duas centrifugações por 5' cada, 1.200 rpm, a 4°C.
- Ressuspender as células em 200 μ L de formaldeído a 2%, diluído em PBS.
- Incubar por 20' em temperatura ambiente.
- Centrifugar por 5', 1.200 rpm a 4°C.
- Ressuspender em 200 μ L de PBS contendo 0,5% de BSA e 1 mM de azida sódica e incubadas *overnight* a 4°C.
- Centrifugar a placa por 5', 1.200 rpm, a 4°C.
- Ressuspender em 150 μ L de tampão de permeabilização (PBS contendo 0,5% de BSA, 1 mM de azida sódica, 10% de saponina).
- Incubar por 10' em temperatura ambiente e centrifugar novamente por 5', 1.200 rpm, a 4°C.
- Adicionar 25 μ L dos anticorpos monoclonais citocina-específicos, em diluição ótima para o uso, determinada anteriormente (exemplo, anti-IL-4), diluídos em tampão de permeabilização.
- Incubar por 25' em temperatura ambiente e centrifugar 2 vezes por 5', 1.200 rpm, a 4°C (ressuspender em 150 μ L de tampão de permeabilização entre as lavagens).
- Lavar pela terceira vez com 150 μ L de PBS contendo 0,5% de BSA e 1 mM de azida sódica.
- Ressuspender em 400 μ L de PBS contendo 0,5% de BSA e 1 mM de azida sódica.
- Ler em citômetro de fluxo BD, utilizando os canais de fluorescência FL1, FL2 e FL3, para isotiocianato de fluoresceína (FITC), R-ficoeritrina (PE) e Ficoeritrina conjugada a cianinas (Cy-chrome) (Cy), respectivamente. Analisar as amostras com a utilização do *software* CellQuest (BD). Delimitar a

região R1 (*gate*) no gráfico de tamanho (FSC) por granulidade (SSC) contendo a população de linfócitos a ser analisada dentre as PBMC obtidas.

Sugestão para a Marcação de uma População Celular

- Determinar a concentração ótima de cada anticorpo, de modo a atingir a maior intensidade de fluorescência com menos *background* possível, titulando em um primeiro experimento entre 1,0 e 0,1 µg de anticorpo por 100 µL de tampão de lavagem para 10⁶ células.
- Quando trabalhando com análises multicoloridas, anticorpos diretamente conjugados podem ser adicionados simultaneamente, o que é melhor que adicioná-los sequencialmente.
- Para diminuir as ligações inespecíficas, que levam a um alto *background*, use bloqueios (*Fc block*), como por exemplo CD32/CD16 em camundongos.
- Caso os marcadores de superfície estudados sejam muito pouco densos, é aconselhável fazer um protocolo de três passos, para amplificar a marcação: usar um anticorpo primário purificado, um anti-Ig biotilado e avidina ou estreptavidina (SAv) conjugada ao fluorocromo como terceiro passo. SAv-PE e SAv Ficoeritrina conjugada a cianinas (Cy-Chrome) são mais “brilhantes” que FITC e podem gerar uma discriminação melhor de antígenos de baixa densidade, especialmente na presença de *Fc Block* para células de camundongo.
- Todo experimento deve incluir controles. Os controles negativos são amostras das populações celu-

lares tratadas da mesma forma que as testadas, com omissão ou modificação de um dos passos de marcação. Exemplos de controles negativos são células não marcadas, células expostas ao segundo passo sozinho, ou células expostas aos controles isotípicos, que devem ser do mesmo isotipo e formato (exemplo, purificado, FITC, PE) do anticorpo primário. Para análise multicolorida, controles de cor única devem ser incluídos.

Mais protocolos para citometria de fluxo podem ser encontrados na internet:

<http://www.bdbiosciences.com/pharmingen/protocols/>

Referências

- Flow cytometry From Wikipedia, the free encyclopedia. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Flow_cytometry> Acessado em 1 Jul. 2006.
- Introducion to Flow Citometry Disponível em: <http://www.bdbiosciences.com/immunocytometry_systems/support/training/online/ITF/> Acessado em 1 jul. 2006.
- Marvin, J. Flow Cytometry Basic Training – A Look inside the Box <www.basic.northwestern.edu/sharedresources/flowcytometry/Flow%20Cytometry%20Basic%20Training.ppt> Acessado em 1 Jul. 2006.
- Pardi, C.C.A. Avaliação de células T CD4+ produtoras de citocinas em residentes de área hipoendêmica brasileira, naturalmente infectados pelo Plasmodium, 2001. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- Table of Fluorochromes Disponível em: <<http://flowcyt.salk.edu/fluor.html>> Acessado em 1 Jul. 2006.

26. Identificação de Proteínas por Imunoistoquímica

*Andréa Mollica do Amarante-Paffaro
Valdemar Antonio Paffaro Junior
Mara Sandra Hoshida
Miriam Rubio Faria
Estela Bevilacqua*

Introdução

Imunoistoquímica ou imunocitoquímica é a técnica que permite a localização de moléculas específicas (antígenos) em células e tecidos utilizando anticorpos. A localização *in loco* destes antígenos em uma reação imunoistoquímica baseia-se na especificidade da reação antígeno/anticorpo. A técnica fundamenta-se em preparar cuidadosamente o tecido ou a célula preservando sua morfologia e, principalmente, a antigenicidade de seus componentes (estrutura e arranjo espacial), para que os anticorpos possam reconhecê-los e associar-se a eles. Os antígenos devem ser também imobilizados no tecido, ou seja, tornados insolúveis para impedir sua difusão durante os procedimentos usuais (Montero, 2003).

Estas reações podem ser realizadas de maneira direta e não amplificada (utilizando apenas um anticorpo) ou indireta e amplificada (utilizando dois ou mais anticorpos) (Renshaw, 2006). No entanto, seja pelo método direto, seja indireto, anticorpos isolados não podem ser observados em microscopia fotônica ou eletrônica. Para que o complexo antígeno-anticorpo seja observado, é necessário que pelo menos um dos anticorpos utilizados seja previamente conjugado a moléculas visíveis ou a moléculas que possam ser visualizadas ao microscópio por meio de reações específicas. Por exemplo, anticorpos podem ser conjugados a enzimas, que podem ser posteriormente identificadas com técnicas histoquímicas simples (revelação) reagindo com agentes cromógenos que conferem coloração ao complexo. Os anticorpos também podem ser conjugados a fluorocromos para serem observados em microscopia de fluorescência ou, ainda, a partículas eletrondensas, como o ouro coloidal, para observação em microscopia eletrônica, sem que seja necessária uma etapa de revelação. Como o produto da reação antígeno-anticorpo é bastante estável, muitas destas reações podem ser mantidas em prepa-

rados permanentes, salvo limitações inerentes à técnica histoquímica utilizada, que pode apresentar diminuição de intensidade ao longo do tempo de estocagem. Esta técnica possibilita excelentes e fidedignos resultados qualitativos em células cultivadas, secções histológicas ou obtidas em criostato, esfregaços, ou ainda em cortes ultrafinos para microscopia eletrônica; atualmente, também algum grau de quantificação pode ser obtido por meio de técnicas modernas de microscopia e análise de imagem (Renshaw, 2006).

Estrutura e Função dos Anticorpos

Os anticorpos são os principais reagentes e o ponto em comum de todas as reações imunoistoquímicas. Estas moléculas pertencem ao grupo proteico das imunoglobulinas e estão presentes no soro; são produzidas por células do sistema imunológico em grande quantidade quando o indivíduo entra em contato com antígenos, ligando-se a estes com alta especificidade. Existem cinco grandes classes de imunoglobulinas (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE). No entanto, os anticorpos mais comumente utilizados em reações imunoistoquímicas fazem parte do grupo das imunoglobulinas dos tipos G (IgG) e M (IgM). Estruturalmente, cada molécula de imunoglobulina é formada por duas cadeias pesadas, semelhantes entre si (H), e duas cadeias leves idênticas (L). Cadeias H diferem quanto às características estruturais e de relacionamento com antígenos, enquanto as cadeias L diferem entre as diferentes subclasses de imunoglobulinas e entre as diferentes espécies. Ligações covalentes entre pontes de dissulfeto ligam cadeias H e L e cadeias H entre si e estabilizam as moléculas de imunoglobulinas. IgGs têm sido amplamente estudadas e parte de sua estrutura foi determinada por estudos utilizando digestão enzimática (Taylor et al., 2002). Tratamento enzimático com papaína (Fig. 26.1) cliva as ligações das pontes de sulfeto na porção N-terminal da molécula en-

tre as cadeias pesadas, o que resulta na liberação de três fragmentos: dois fragmentos denominados de Fab (*antigen-binding fragment*) e um fragmento cristalino, Fc (*crystalline fragment*). Ambas as cadeias, leve e pesada, da porção Fab contêm uma região variável e uma constante, sendo que a variável é responsável pelo reconhecimento imunológico, ou seja, pela ligação específica com um determinante antigênico ou epítipo, enquanto a região Fc, contendo apenas regiões constantes, pode se ligar a receptores teciduais e componentes do sistema complemento. Sob a ação da pepsina (Fig. 26.1), ocorre a clivagem da molécula de imunoglobulina na sua porção C-terminal gerando um fragmento único bivalente $F(ab')_2$. Os fragmentos gerados Fab e $F(ab')_2$ também podem ser utilizados em reações imunoistoquímicas; por serem desprovidos do fragmento Fc, têm a vantagem de eliminar ligações inespecíficas, eventualmente associadas a esta região da molécula de imunoglobulina (Davies et al., 1990).

Em toda reação imunocitoquímica utilizamos um anticorpo primário, que é o responsável pelo reconhecimento do antígeno pesquisado. Se este anticorpo já estiver acoplado a uma molécula que permita sua identificação (enzima, fluorocromo etc.), esta reação é chamada de direta. Caso não esteja, é necessária a utilização de um segundo anticorpo contendo moléculas identificáveis. Este segundo anticorpo denominado de secundário reconhece imunoglobulinas do animal em que o anticorpo primário foi produzido (Fc, conservada dentro da espécie) e desta forma reconhece e liga-se especificamente ao anticorpo primário; neste caso identifica-se o anticorpo secundário ligado ao primário e esta reação é designada indireta.

O anticorpo primário utilizado pode ser de dois tipos: policlonal ou monoclonal (Polak e Van Noordien, 1986). O anticorpo monoclonal reconhece no antígeno, de forma específica, um único epítipo ou sítio antigênico, região esta geralmente constituída por 8 a 10 aminoácidos (Fig. 26.2). Este anticorpo é produzido por um único clone de células originadas da fusão entre as células da linhagem plasmocitária do animal imunizado e células de linhagem tumoral (hibridoma). O anticorpo policlonal, por sua vez, é constituído por uma mistura de anticorpos que reconhecem diferentes epítopos de um mesmo antígeno (Fig. 26.2). O soro de um animal sensibilizado por um antígeno produz diferentes e específicas imunoglobulinas para cada um dos numerosos sítios antigênicos de uma molécula-alvo.

Os anticorpos monoclonais têm a vantagem da homogeneidade das reações devido a sua alta especifici-

dade (ligam-se a apenas uma região do antígeno e não incluem outros anticorpos, que podem eventualmente reconhecer epítopos que não pertencem às moléculas-alvo). Em decorrência desta especificidade, entretanto, pode haver uma reação positiva insatisfatória ou pouco intensa, de difícil observação. Já os anticorpos policlonais geram uma reação mais intensa na medida em que reconhecem e reagem com vários epítopos de uma mesma molécula, porém, como explicado acima, não raro, podem se ligar a epítopos de moléculas estruturalmente semelhantes às do antígeno desejado, gerando reações inespecíficas (reações cruzadas). Estas reações podem ser removidas por meio de reações de adsorção específicas. Uma vantagem das reações em que anticorpos policlonais são utilizados é a grande possibilidade de reação mesmo que alguns epítopos tenham sido modificados pelos procedimentos histológicos de rotina. Na reação com anticorpos monoclonais, que têm como alvo apenas um único epítipo, é preciso certificar-se quais procedimentos podem ser realizados sem que ocorra modificação da estrutura do epítipo em questão. Para testar inicialmente um anticorpo primário, é recomendável incluir diferentes diluições (1:25, 1:50, 1:100 e 1:200) em intervalos de pH de 6,0 a 8,6 em soluções que não contenham NaCl, como é o caso do tampão fosfato-salina, embora este seja amplamente utilizado (Davies, et al., 1990; Boenisch, 1999).

Estas possibilidades e as características do antígeno tornam cada reação única e merecedora de extremo cuidado e atenção para a escolha dos anticorpos primários e para o estabelecimento dos critérios que devem ser considerados para tornar uma reação imunoistoquímica eficaz e fidedigna (Tabela 26.1).

A visualização da reação antígeno-anticorpo em uma reação imunoistoquímica também depende da afinidade do anticorpo ao epítipo. Esta propriedade é determinada pela sequência de aminoácidos da região variável da cadeia pesada da imunoglobulina e pela capacidade desta região de interagir especificamente com o epítipo. Isto envolve também interações iônicas, forças de van der Waals e pontes de hidrogênio entre o epítipo e esta região (Wilson, 1991). Anticorpos de alta afinidade podem ser utilizados em baixas concentrações e dificilmente se dissociam do epítipo se as condições forem adequadamente mantidas. Nesta fase, condições que favoreçam o enfraquecimento da ligação antígeno-anticorpo (que é uma reação reversível) devem ser evitadas, tais como utilização de altas concentrações de sais nos tampões de lavagem e processamento dos materiais, altas temperaturas, baixo pH e lavagens muito drásticas das amostras.

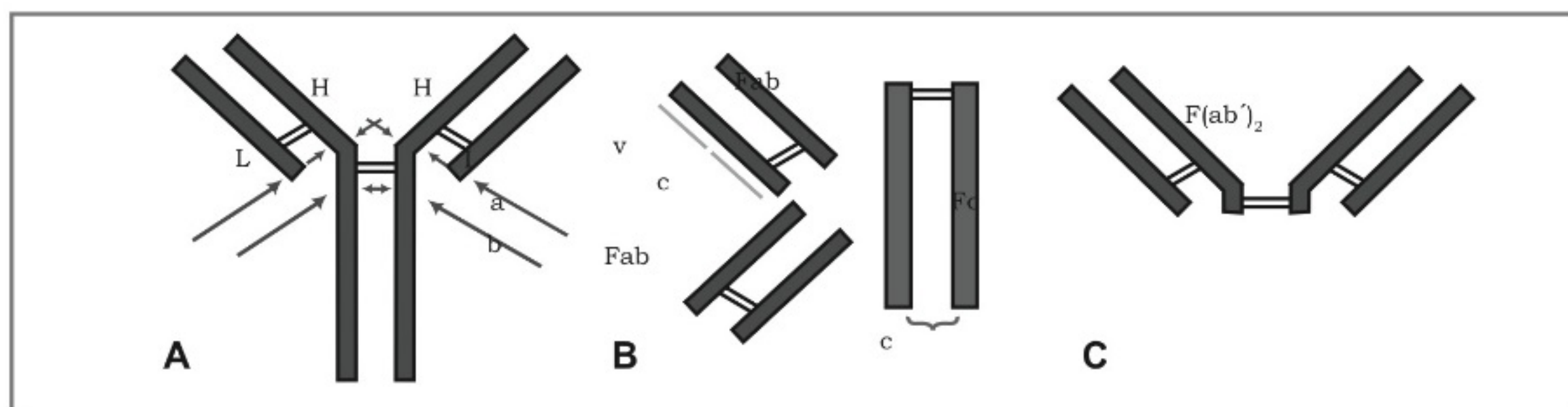


Figura 26.1 – Estrutura da molécula de imunoglobulina G (IgG). **(A)** A molécula é constituída por duas cadeias pesadas (H) ligadas entre si por pontes dissulfeto e duas cadeias leves (L). As setas indicam pontos de clivagem com papaína (a) e com pepsina (b). **(B)** Fragmentos gerados pela digestão com papaína: fragmentos Fab – região variável da molécula do anticorpo que se liga ao determinante antigênico e fragmento Fc – região conservada do anticorpo que se liga ao tecido e/ou a proteínas do sistema complemento, (v e c), respectivamente, indicam as regiões variáveis e constantes da IgG. **(C)** Fragmento F(ab')₂ gerado após digestão enzimática com pepsina. Sob esta ação enzimática, o fragmento Fc é destruído.

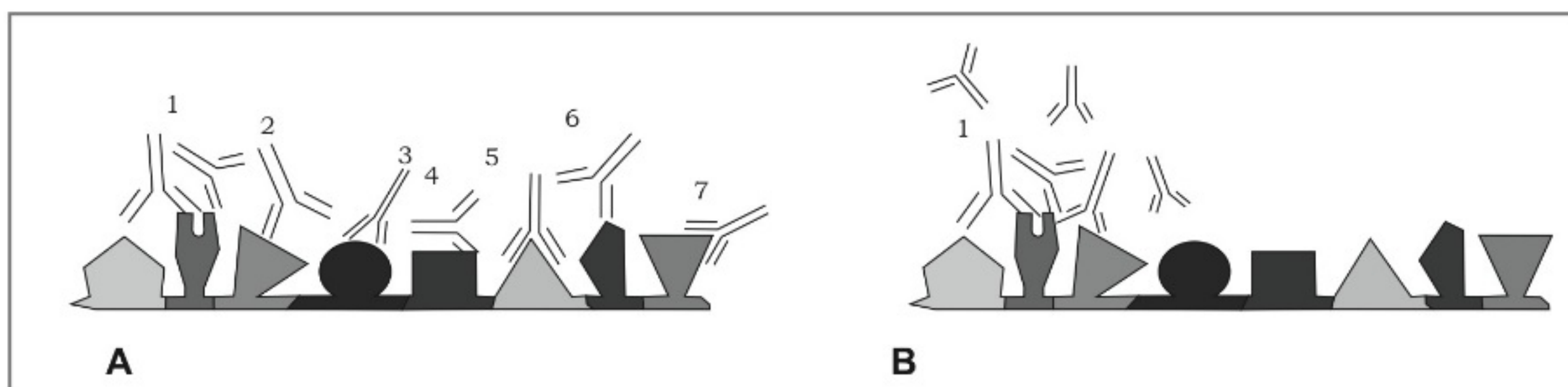


Figura 26.2 – Tipos de anticorpos. **(A)** Anticorpos policlonais são misturas de imunoglobulinas (1-7) que reconhecem diferentes epítomos (A-H) de um antígeno. **(B)** Anticorpos monoclonais, por sua vez, são misturas de imunoglobulinas idênticas produzidas a partir de um único clone de células contra 1 único epítopo em um antígeno.

Tabela 26.1 – Características dos anticorpos monoclonais e policlonais quanto ao desempenho em reações imunoistoquímicas.

Características	Anticorpos monoclonais	Anticorpos policlonais
Ligação com antígeno	Reconhecem apenas um epítopo em um antígeno	Reconhecem vários epítomos em um antígeno
Intensidade da reação	Menos intensa	Mais intensa
Reatividade cruzada	Normalmente muito fraca ou inexistente	Pode ocorrer
Reação de fundo	Fraca ou inexistente	Pode ocorrer
Sensibilidade	Maior sensibilidade	Menor sensibilidade
Imunoglobulinas	Pertencem a uma única classe ou subtipo (homogêneos)	Classes ou subtipos variados
Reprodutibilidade	Muito boa	Podem variar de acordo com o lote e qualidade do anticorpo
Variáveis ambientais	Mais sensíveis a variações de concentração, pH e temperatura	Menos sensíveis a variações de concentração, pH e temperatura
Fixação	Epítopo único pode ser suscetível a fixadores. Resultados negativos têm que ser confirmados em materiais a fresco ou mantidos sob congelamento	Geralmente com reatividade adequada mesmo após uso de formol

Embora sob condições ideais, a reação antígeno-anticorpo possa ser estabelecida rapidamente, deve-se considerar que as condições de uma reação imunoistoquímica utilizando amostras fixadas e processadas para inclusão em parafina ou outras resinas não são ideais. Dependendo destas condições (e de outras, tais como a concentração utilizada do anticorpo e a temperatura da reação), podem ser necessários extensos períodos de até 48 horas para que se atinja o máximo de reatividade ou o uso de altas concentrações do anticorpo. No entanto, o uso de altas concentrações por períodos curtos deve ser considerado sempre que possível, para se evitar a formação de reações inespecíficas.

Métodos Imunoistoquímicos

Como referido anteriormente, a reação imunocitoquímica pode ser realizada de modo direto ou indireto e utilizar diferentes formas de visualização do complexo antígeno-anticorpo. Aqui descrevemos alguns dos métodos mais utilizados em imunoistoquímica para observação em microscopia de luz convencional, em microscopia eletrônica e em microscopia de fluorescência, além das vantagens e desvantagens de cada método. Lembrar que a escolha do método a ser utilizado deve considerar o antígeno que está sendo investigado, as características do anticorpo primário disponível, o grau de sensibilidade exigido pela reação, o tempo para execução da reação, o pH e o custo dos reagentes utilizados (Boenisch, 1999, 2001).

Formas de Visualização do Complexo Antígeno-anticorpo

Método Imunoenzimático

Enzimas são proteínas que possuem a propriedade de catalisar reações químicas. Nas reações imunoistoquímicas, elas podem ser conjugadas a anticorpos e posteriormente reveladas, por meio de reações enzima-substrato capazes de converter substâncias incolores em produtos finais coloridos, como uma forma de permitir a localização do anticorpo. Os métodos que utilizam estas reações são denominados de imunoenzimáticos (Shi et al., 1988; Milde et al., 1989). Nestes métodos, geralmente são utilizadas as enzimas peroxidase, extraída das raízes do rabanete (HRP – *horseradish peroxidase*), e a fosfatase alcalina (AP – *alkaline phosphatase*), extraída de intestino bovino.

A peroxidase é uma enzima de 40 kDa que pode ser histoquimicamente visualizada por meio da reação com o peróxido de hidrogênio e posterior oxida-

ção de um componente doador de elétrons, o que gera um precipitado visível, insolúvel e marrom-escuro no sítio da reação enzimática. Existem vários doadores de elétrons que quando oxidados geram precipitados insolúveis coloridos e que por esta razão são chamados de cromógenos. Dentre estes, o mais utilizado é o DAB (3,3' – tetracloro de diaminobenzidina, que produz um produto marrom), por resistir a procedimentos histológicos, pela possibilidade de ser visualizado em preparados ultraestruturais e pela intensidade de sua reação. Também são frequentemente utilizados o AEC (2,3-amino-9-etilcarbazol, com um produto final avermelhado), o CN (4-cloro-1-naftol, que gera um produto final azul) e o reagente de Hanker-Yates (*p*-fenilenodiamino diidrocloreto/pirocatecol, de cor azul-escuro). Entre estes, o único insolúvel em álcool é o reagente de Hanker-Yates, de modo que cuidados devem ser tomados para não desidratar o material após esta reação. A técnica da imunoperoxidase também é adequada para a detecção ultraestrutural de antígenos. O precipitado formado como produto desta reação enzimática é insolúvel e eletrondenso. O bloqueio da peroxidase endógena requer a utilização de peróxido de hidrogênio em quantidades excessivas na ausência do cromógeno. Dessa forma, a ligação peroxidase endógena-peróxido de hidrogênio inibe a ação enzimática endógena, e a única enzima a ser revelada é a introduzida na amostra conjugada ao anticorpo (Shi et al., 1988).

A enzima fosfatase alcalina (100 kDa) remove por hidrólise e transfere grupos fosfatos de ésteres orgânicos (substrato) em pH alcalino, formando fenóis e fosfatos, produtos solúveis e sem cor. Para serem visualizados, os fenóis resultantes devem reagir com agentes de captura como os sais de diazônio formando corantes insolúveis, coloridos e, portanto, visíveis ao microscópio de luz. A fosfatase alcalina endógena é inibida pelo levamisol, o qual pode ser incorporado ao meio de incubação da reação, uma vez que não age sobre a fosfatase alcalina de bovinos conjugada ao anticorpo. Como substratos, são comumente utilizados o naftol AS-MX fosfato, o naftol AS-BI fosfato e o naftol AS-TR fosfato. Em associação, são frequentemente utilizados como cromógenos o *Fast Red TR* e o *Fast Blue BB*, tomando-se o cuidado de evitar o etanol e outros solventes orgânicos após seu uso. Como opção para preparados mais duráveis, pode-se utilizar também *New Fuchsin* como cromógeno, cujo produto é resistente ao etanol e outros solventes (Taylor et al., 2002).

Imunofluorescência

Alternativamente ao método imunoenzimático também podem ser utilizados fluorocromos para a observação das reações imunoistoquímicas sob microscopia de fluorescência. O uso de anticorpos conjugados com fluorocromos, dessa forma, caracteriza a técnica da imunofluorescência. Os fluorocromos excitados pela luz polarizada (tungstênio-halogênio, mercúrio ou *lasers*) do microscópio de fluorescência emitem luz por determinado período; esta, por sua vez, pode ser visualizada utilizando-se filtros na frequência de onda adequada. Atualmente, uma grande variedade de fluorocromos pode ser comercialmente encontrada; os naturais mais comumente utilizados são a fluoresceína (verde) e a rodamina (vermelho) e, entre os sintéticos, o Cy2 (verde) e o Cy3 (vermelho). Para a utilização de filtros (na microscopia de fluorescência) e *lasers* apropriados (na microscopia confocal) para a excitação dos fluorocromos, é necessário conhecer-se o espectro de excitação e a emissão de luz destas moléculas. A tabela 26.2 mostra estas características para os principais fluoróforos utilizados em microscopia de fluorescência ou em microscopia de confocali-

dade. Se a marcação for citoplasmática, pode-se ainda realizar contracolorações com fluoróforos de afinidade natural ao DNA, tais como Hoechst, DAPI (4'6'-diamidino-2-fenilindol), brometo de etídio e iodeto de propídeo (Coons e Kaplan, 1950).

Método Imunocoloidal

O uso de partículas de ouro coloidal, principalmente para imunocitoquímica (imunoistoquímica ultraestrutural), foi introduzido por Faulk e Taylor em 1971. Desde então, o uso do ouro coloidal tem sido amplamente utilizado para a detecção de antígenos celulares devido a sua característica particulada e densa, por ser facilmente identificável à microscopia eletrônica, por apresentar dimensões adequadas e não obstruir a visualização da estrutura a que está ligado, por ser encontrado em diferentes dimensões e, portanto, permitir marcações múltiplas em um mesmo tecido (partículas de várias dimensões associadas a diferentes anticorpos primários), por permitir a quantificação dos resultados e por ser facilmente conjugado a imunoglobulinas ou proteína A.

Tabela 26.2 – Espectro máximo de excitação (Ex) e emissão (Em) em nm dos principais fluoróforos utilizados em microscopia de fluorescência ou em microscopia de confocalidade.

	Ex (nm)	Em (nm)	MW
Fluoresceína, FITC	495	519	389
Rodamina, TRITC	547	572	444
Texas Vermelho	589	615	625
Colorações com cianina			
Cy2 (cianina 2)	489	506	714
Cy3 (indocarbonocianina)	550	570	767
Cy3.5	581	596	1102
Cy5 (indodicarbocianina)	650	670	792
Cy5.5	675	694	1128
Cy7 (cianina 7)	743	767	818
Para contracoloração nuclear			
Hoechst 33342	343	483	616
DAPI	345	455	
Hoechst 33258	345	478	624
SYTOX-Azul	431	480	~400
SYTOX-Verde	504	523	~600
SYTOX-Laranja	547	570	~500
Brometo de etídio	493	620	394
Laranja de acridina	503	530/640	
Iodeto de propídeo (PI)	536	617	668,4

Embora muitas técnicas estejam descritas na literatura (Nagle et al., 1983; Bullock e Petrusz, 1989), as mais comumente utilizadas são a direta, em que o anticorpo primário está diretamente associado à partícula de ouro, ou a indireta, em que são os anticorpos secundários que estão ligados a estas partículas. Estas reações podem ser diretamente realizadas em cortes ultrafinos de material processado para microscopia eletrônica, desde que os cuidados para a manutenção da antigenicidade (uso de fixadores e tempo de fixação adequados ou ainda de resinas especiais) tenham sido tomados. Em geral, oferecem resultados de excelente qualidade e resolução.

A utilização desta técnica em cortes de parafina requer alguns ajustes para a visualização adequada das partículas que medem de 1 a 15 nm de diâmetro, e que, portanto, são muito pequenas para uma resolução adequada à microscopia de luz (ML) (Fegurson et al., 1998). Nestas reações, uma reação adicional final é introduzida ao sistema: uma mistura de lactato de prata (formação de depósitos de prata sobre a partícula de ouro tornando-a maior e passível de ser visualizada à ML), hidroquinona (redução e enegrecimento dos sais de prata) e goma-arábica (bloqueio do processo de autonucleação da prata, o que evita a formação de resíduos celulares).

Variação desta técnica inclui a conjugação de partículas de ouro coloidal à proteína A (produzida por *Staphylococcus aureus*), em substituição à associação com um anticorpo secundário. Isto se baseia no fato de que a proteína A é um polipeptídeo com especial afinidade pela fração Fc de imunoglobulinas, principalmente IgGs. Esta afinidade varia com a espécie em que o anticorpo foi produzido; por exemplo, a proteína A tem maior afinidade por IgG de coelho do que de IgG de camundongo (para mais detalhes sobre o uso de ouro coloidal conjugado à proteína A, ver Pound, 1998).

Reações Imunoistoquímicas

Método Direto

Neste método utiliza-se o anticorpo primário que, especificamente, reconhece a molécula-alvo na amostra, conjugado a uma enzima (peroxidase, fosfatase alcalina etc.) ou a um fluorocromo ou, ainda, a outro tipo de marcador visível (ferritina, ouro coloidal) em sua porção Fc (Fig. 26.3). Como este método utiliza apenas um anticorpo, a probabilidade da ocorrência de reações inespecíficas ou de fundo é baixa. No entanto, o método direto resulta em reações específicas mais fracas do que as obtidas com o método indireto, além de ser mais dispendioso, o que torna sua utilização menos frequente.

Método Indireto

Utilizando mais de um anticorpo conjugado a uma enzima

No método indireto de preparação de uma reação imunoistoquímica, além do anticorpo primário, são também utilizados anticorpos secundários (anticorpos que reconhecem a porção Fc do anticorpo primário) e eventualmente anticorpos terciários (contra a porção Fab do anticorpo secundário). Nestas reações, são estes anticorpos (secundários ou terciários) que são conjugados a enzimas, fluorocromos ou marcadores para sua posterior detecção. A estratégia do sistema utiliza incubações sucessivas, inicialmente com o anticorpo primário não conjugado, seguido pelo anticorpo secundário conjugado a uma molécula para sua evidência (Fig. 26.4).

Estes métodos são mais versáteis que o direto, pois uma ampla variedade de anticorpos primários pode ser utilizada com um mesmo anticorpo secundário e/ou terciário. Além disso, a intensidade da reação é maior, na medida em que várias moléculas de anticorpo secundário podem reagir com mais de um epítipo na região Fc do anticorpo primário, aumentando assim o número de moléculas de enzima na reação. A intensidade da reação é ainda maior quando se utiliza um anticorpo terciário. No entanto, quanto maior o número de anticorpos utilizados, maior a probabilidade de ocorrência de reações inespecíficas ou de reações cruzadas entre os anticorpos e as imunoglobulinas teciduais do espécime. Esta reatividade cruzada, no entanto, pode ser inibida por meio da pré-adsorção do anticorpo secundário com imunoglobulinas da mesma espécie do antígeno investigado.

Utilizando técnicas Antienzima-enzima para Amplificar a Reação

Estes métodos, também denominados métodos do anticorpo não marcado, utilizam um anticorpo primário não conjugado seguido de um anticorpo secundário também não marcado e um complexo anticorpo antienzima-enzima. O anticorpo primário e o anticorpo do complexo antienzima-enzima devem ser obtidos na mesma espécie para que o anticorpo secundário se ligue através de suas porções Fab às porções Fc dos dois anticorpos (Fig. 26.5).

Os métodos utilizando anticorpos não marcados são denominados conforme o complexo imunoenzimático utilizado. Assim sendo, no método PAP utiliza-se o complexo Peroxidase-Anti-Peroxidase, e no método APAAP, o complexo Fosfatase Alcalina-Anti-Fosfatase

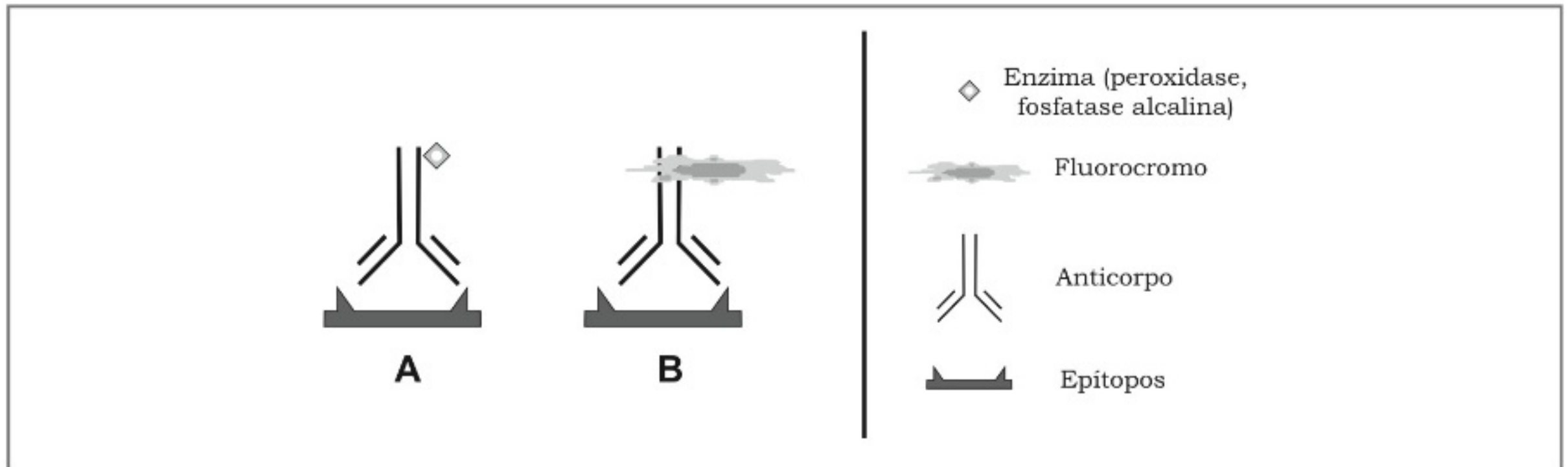


Figura 26.3 – Sistema direto de detecção do antígeno em reações imunoistoquímicas. O anticorpo primário que pode ser conjugado a uma enzima (A) ou a um fluorocromo (B) na sua porção Fc reconhece especificamente o antígeno através de sua porção variável, Fab.

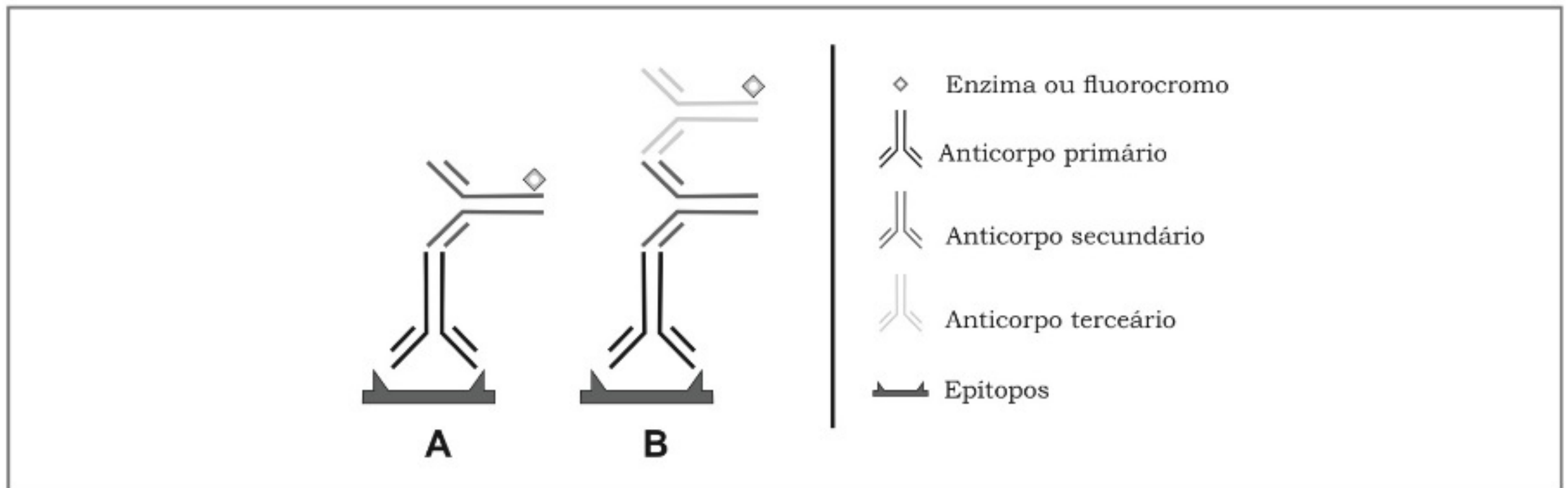


Figura 26.4 – Sistemas indiretos de detecção do antígeno. (A) Sistema de detecção indireta de dois passos, no qual o anticorpo secundário está conjugado a uma enzima para sua posterior detecção. (B) Sistema de detecção indireta de três passos, no qual é o anticorpo terciário que está conjugado a uma enzima.

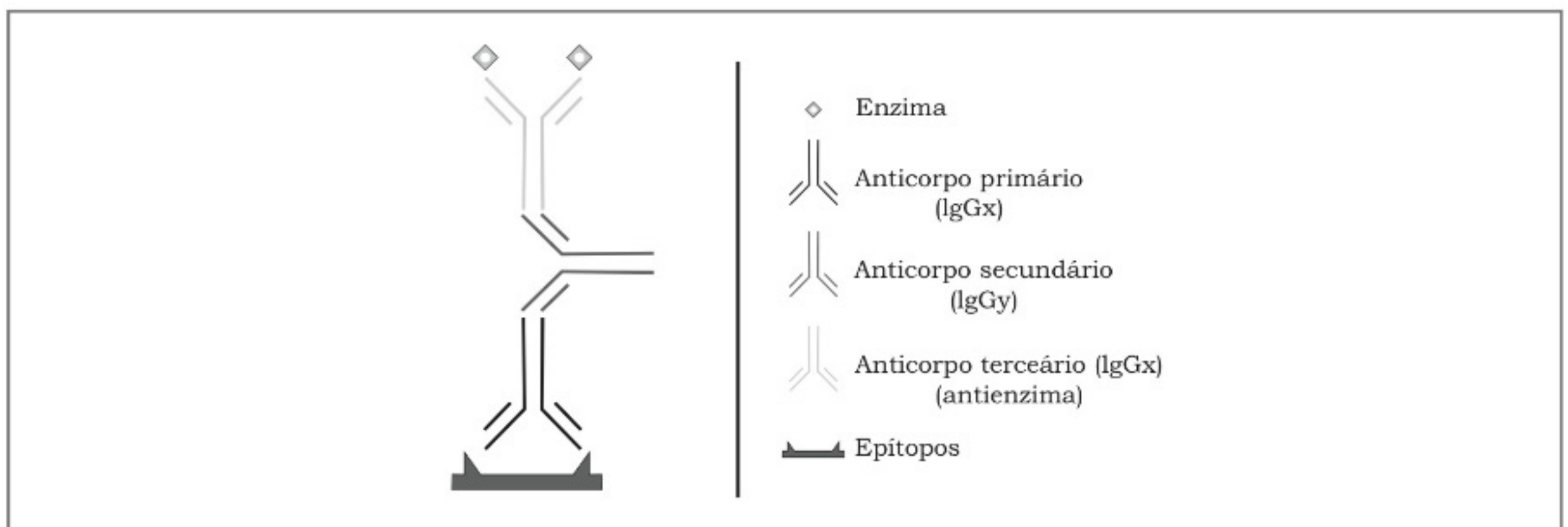


Figura 26.5 – Método de detecção indireta do complexo imunoenzimático. Neste procedimento, utiliza-se a enzima e um anticorpo anti-enzima. O anticorpo secundário reconhece a porção Fc do anticorpo primário e do terciário, que é o anticorpo anti-enzima já associado a seu antígeno, a enzima.

Alcalina. Estes métodos são mais sensíveis do que os descritos anteriormente porque são baseados na alta afinidade do anticorpo terciário à enzima (antígeno), conferindo maior estabilidade ao complexo, além de aumentar relevantemente a quantidade de moléculas de enzima em cada sítio antigênico-alvo.

Utilizando os complexos estreptavidina-biotina ou avidina-biotina

Métodos imunoistoquímicos também podem ser baseados na alta afinidade que a estreptavidina, proveniente do *Streptomyces avidinii*, e a avidina, proveniente do albúmen, têm pela biotina (Giorno, 1984; Oros et al., 1996). Ambas possuem quatro sítios de ligação para a biotina. No entanto, a avidina tem a desvantagem de ser uma glicoproteína e associar-se inespecificamente a componentes teciduais carregados negativamente em pH fisiológico e por isto tem sido substituída pela estreptavidina. Os métodos utilizando o sistema estreptavidina-biotina são mais sensíveis que os métodos PAP e APA-AP e, por este motivo, têm sido bastante utilizados.

Geralmente, utiliza-se o método enzimático associado ao complexo estreptavidina-biotina (*ABC-avidin biotin complex*) ou simplesmente à estreptavidina. Nestes procedimentos, segue-se a incubação com o anticorpo primário, incubação com o anticorpo secundário biotinilado (contra a porção Fc do anticorpo primário) e, subsequentemente, a adição do complexo enzima-estreptavidina ou biotina-estreptavidina-enzima. Ambos se ligam à biotina do anticorpo secundário, mas a pre-

sença da biotina no complexo amplifica grandemente a reação (Fig. 26.6). As enzimas mais utilizadas são a peroxidase e a fosfatase alcalina.

Utilizando anticorpos conjugados a fluorocromos

Métodos imunofluorescentes também podem ser do tipo direto ou indireto, seguindo os mesmos princípios do método imunoenzimático, em que as enzimas são substituídas por fluorocromos nos anticorpos primários, secundários ou mesmo terciários. Também podem ser empregados anticorpos primários, secundários ou terciários biotinilados e estreptavidina conjugada a um fluorocromo.

Controles

Controles teciduais e dos reagentes utilizados são fundamentais para a adequada interpretação dos resultados de reações imunoistoquímicas.

Para se assegurar que os anticorpos secundários e primários sejam específicos quanto às suas ligações com os epítomos-alvo, controles teciduais que sabidamente contêm e não contêm estes epítomos devem ser simultaneamente testados. Tecidos controle-positivos também devem ser utilizados para determinar as concentrações ideais dos anticorpos e outros detalhes metodológicos importantes, como, por exemplo, a ação de diferentes fixadores e tempos de incubação, entre outros. Anticorpos secundários melhores são aqueles submetidos à adsorção por afinidade, o que impede sua adesão de forma não específica a proteínas teciduais em geral.

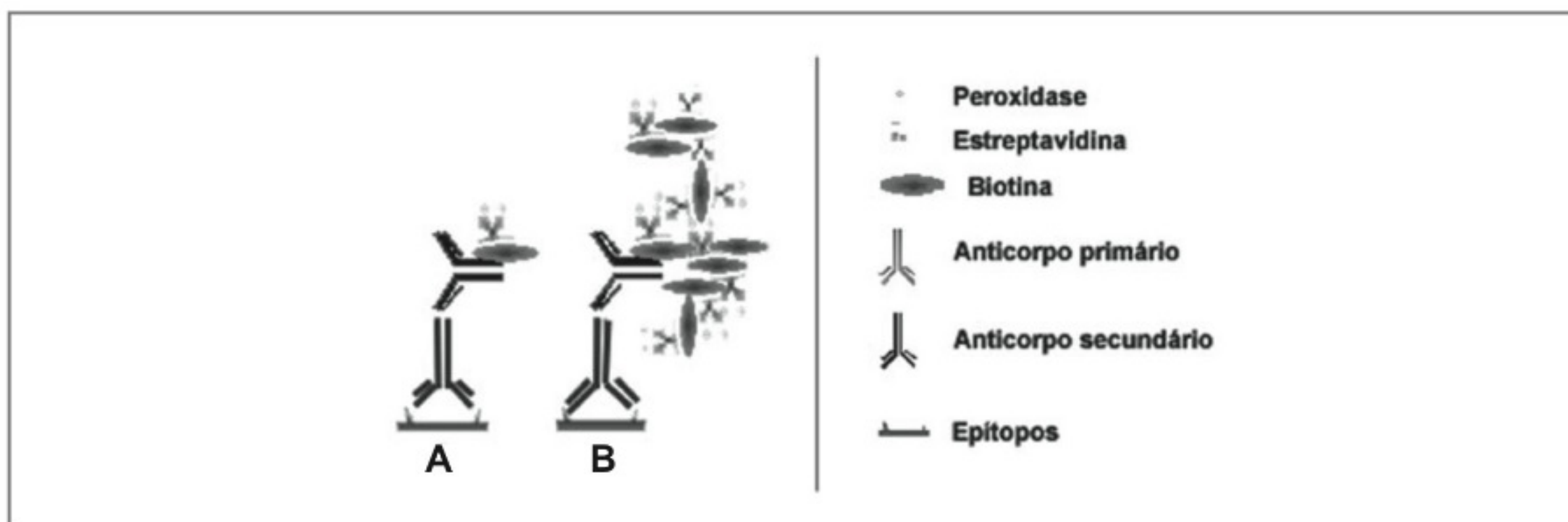


Figura 26.6 – Método de detecção indireto utilizando o complexo estreptavidina-biotina. Em ambos os modelos, o anticorpo secundário biotinilado foi adicionado ao sistema após a incubação com o anticorpo primário não marcado. (A) Há amplificação do sistema na medida em que a biotina do anticorpo secundário estabelece relações com o complexo estreptavidina-peroxidase (ABC). (B) Este modelo é semelhante ao observado em A, no entanto a reação é muitas vezes amplificada devido à formação de grandes complexos de moléculas após a adição de biotina-estreptavidina-peroxidase (LSAB).

Controles internos também devem ser realizados nas amostras de tecido-alvo, por meio de reações imunoistoquímicas para outras proteínas sabidamente presentes como uma forma de avaliar as condições teciduais. Estes resultados são particularmente importantes para calibrar as condições de fixação e outras manipulações a que o material está sujeito antes de se iniciar a reação imunoistoquímica.

Para assegurar a especificidade do anticorpo primário, pode-se realizar a reação imunoistoquímica omitindo-se a incubação com este reagente. Melhores resultados, entretanto, são obtidos quando a incubação com o anticorpo primário é substituída pela própria fração do anticorpo primário ou antissoro submetido previamente à adsorção de afinidade com o antígeno purificado. Outras possibilidades mais rápidas e de baixo custo incluem a incubação com o soro não imunizado ou com a fração de imunoglobulina destes soros não imunizados obtidos de animais da mesma espécie em que o anticorpo primário foi produzido ou, ainda, a utilização de anticorpos primários não relevantes que sabidamente não devem reagir com os componentes da amostra de estudo. Ambos devem ser utilizados nas mesmas concentrações do anticorpo primário.

Fixadores

Uma das etapas principais da reação imunoistoquímica é a preservação dos tecidos e consequentemente dos antígenos nele presentes. Geralmente isto é conseguido com o uso de fixadores. Estes minimizam a autólise e as mudanças estruturais pós-morte dos tecidos e a contaminação por microrganismos. Por outro lado, estabilizam a posição dos antígenos evitando interpretações errôneas. Diferentes fixadores podem ser empregados para este fim; nem sempre, entretanto, os métodos de fixação permitem ao mesmo tempo a manutenção da estrutura tecidual e a preservação adequada dos antígenos e, por conseguinte, esta é uma etapa que requer cuidados especiais (Polak e Van Noordien, 1986). Conhecer a natureza do antígeno e as propriedades do método de fixação a ser utilizado é essencial para a interpretação dos resultados de uma reação imunoistoquímica.

Mais comumente, utilizam-se materiais embebidos em parafina e fixadores à base de formol, sendo, o formol neutro (formaldeído a 10%) em solução-tampão (para manter a osmolaridade e pH) o mais frequente, proporcionando, boa preservação, boa penetração e bons resultados nas reações imunoistoquímicas (Puchtler e Meloy, 1985; Volk et al., 2005). Estes fixadores atuam principalmente sobre os componentes ce-

lulares proteicos reagindo com aminoácidos formando ligações cruzadas. Fixação de pequenos fragmentos de tecidos (não maiores que 1×1 cm) por até 24 horas em formol tamponado geralmente oferece boas condições para as reações imunoistoquímicas. Antes de testar outras variações para otimizar o método em seu material, estas condições devem ser testadas.

Caso o antígeno não se preserve adequadamente nestas condições, tratamentos de resgate antigênico podem ser realizados (Shi et al., 1991, 2007; Cattoretti et al., 1993; Frost et al., 2000; Miller et al., 2000; Boenisch, 2001). Em geral, estes pré-tratamentos consistem em utilizar enzimas capazes de digerir parte dos componentes teciduais para facilitar o acesso do anticorpo ao antígeno, principalmente quando o anticorpo é policlonal. A literatura mostra resultados bastante satisfatórios com a utilização de tripsina, pepsina e pronase, embora muitas outras enzimas já tenham sido testadas. Cuidados são sempre necessários porque este tratamento pode também digerir o epítipo em questão.

Quando o anticorpo é monoclonal (e, portanto, selecionado a partir da forma nativa do antígeno), deve-se ter certeza de que o formol não está reagindo diretamente com o epítipo, mascarando-o ou modificando sua conformação espacial ou, ainda, que os procedimentos para a embebição em parafina não tenham destruído este epítipo (epítipos sensíveis à temperatura ou a etanol/xilol).

Outra forma de se otimizar este procedimento e resgatar a antigenicidade da amostra é a exposição do material ao calor até temperaturas próximas à ebulição da água em soluções contendo metais ou em 0,01 M de tampão citrato (pH 6,0) ou ainda em 0,1 M de tampão Tris-HCl (pH 8,0) e 1 mM de EDTA (pH 8,0) em forno micro-ondas, placas de pressão ou banhos-maria (Shi et al., 1991; Cattoretti et al., 1993; Battifora et al., 1999). O uso de formas combinadas de resgate antigênico utilizando digestão enzimática e aquecimento também é possível (Iczkowski et al., 1999). O aquecimento da amostra é responsável pela reversão dos danos causados pela fixação com formol (reversão das ligações cruzadas entre os aminoácidos e o formol) e embebição em parafina na maioria das amostras, no entanto, o exato mecanismo de ação desta metodologia ainda é incerto.

Caso o material fixado em formol tamponado, embebido em parafina e submetido a resgates antigênicos não ofereça bons resultados, cortes de material congelado em criostato devem ser testados. Estes oferecem a vantagem de preservação das amostras sem os procedimentos deletérios da embebição em parafina e, também,

se necessário, sem que o material tenha sido quimicamente alterado por fixadores. Como desvantagem, há uma perda significativa dos detalhes morfológicos e da resolução, uma vez que os cortes são obrigatoriamente mais espessos. Por outro lado, a ausência de fixação ou fixação incompleta com etanol e/ou acetona pode acarretar rápida autólise e destruição dos tecidos (perda de membranas e lise nuclear nestes casos são frequentemente observadas). Se a fixação não for o problema para a realização da reação imunoistoquímica, as amostras podem ser fixadas com formol tamponado.

De qualquer forma, a utilização de cortes de criostatato (material congelado) com ou sem prévia fixação ajudará a determinar a sensibilidade do antígeno, se isto ainda não for conhecido, e ainda permitirá os ajustes necessários para a obtenção de reações adequadas.

Obviamente, outros fixadores podem ser testados, tais como fixadores à base de cloreto de mercúrio ou ainda paraformaldeído-lisina-periodato (PLP). Este último tem sido particularmente utilizado (McLean e Nakane, 1974) para a preservação de epítomos de superfície celular. Enquanto o formaldeído preserva as proteínas, o periodato reage com os carboidratos de superfície e formam aldeídos que se ligam à lisina oferecida, estabilizando-os. A morfologia geral do tecido, entretanto, perde em qualidade em comparação com o formol tamponado.

Recentemente, também têm sido utilizados com sucesso fixadores de base alcoólica, como o Metacarn, compostos por metanol, clorofórmio e ácido acético (60:30:10 v/v). O metanol substitui e compensa a baixa penetração do etanol, enquanto o clorofórmio e o ácido acético fixam as proteínas por coagulação, sem, entretanto, alterar a estrutura primária destas moléculas (Mitchell et al., 1985).

Para a realização de imunoeletromicroscopia ou imunocitoquímica, mais cuidados devem ser tomados. As fixações convencionais com glutaraldeído nas concentrações rotineiramente utilizadas (2,5%) e o tetróxido de ósmio costumam mascarar grande parte dos epítomos antigênicos. Uma possibilidade nestes casos é o uso de reagentes (peróxido de hidrogênio ou metaperiodato de sódio) capazes de desbastar resíduos superficiais do tecido, minimizando os efeitos do ósmio. Outra possibilidade é o uso de paraformaldeído associado a baixas concentrações de glutaraldeído (0,1 a 0,2%) sem pós-fixação com o tetróxido de ósmio. Resinas especiais, de polimerização a baixas temperaturas, também podem ser utilizadas para antígenos sensíveis à temperatura (Lowicryl, LR White ou LR Gold).

Fluxograma de Trabalho

A técnica de imunocitoquímica pode ser empregada de diferentes modos em uma gama muito variável de procedimentos laboratoriais, de modo que a seleção do melhor método e parâmetros a serem utilizados vai depender da questão biológica a ser abordada, de ensaios de padronização das variáveis técnicas e, acima de tudo, da compreensão do modelo pelo pesquisador. Na sequência, o fluxograma de trabalho (Fig. 26.7) dá uma ideia das possibilidades de processamento das amostras biológicas para a realização de reações imunoisto/citoquímicas.

Protocolos, Reagentes e Soluções

Neste item serão descritas apenas as técnicas utilizadas rotineiramente para preparados histológicos de material embebido em parafina ou equivalente, para lamínulas contendo células cultivadas aderidas e para materiais processados para observação em microscópio eletrônico. Da mesma forma apenas serão mencionadas as soluções de uso mais frequente (Tabela 26.3).

Tabela 26.3 – Soluções e reagentes.

Tampão Tris Solução-estoque	6,075 g de Tris - (hidroximetil) aminometano e 8,8 g de cloreto de sódio Água destilada q.s.p. 100 mL	Ajustar pH (7,6) com HCl 1 N Guardar em geladeira
Tampão Tris Solução de uso	Diluir solução-estoque 1:10 (v/v) em água destilada	Conferir pH antes de usar
Solução fixadora Formol a 4% tamponado pH 7,0	100 mL de formol (formaldeído a 40%, p/v) 4 g de fosfato de sódio monobásico, monoidratado 6,5 g fosfato de sódio dibásico, anidro Água destilada q.s.p. 1.000 mL	Solução estável por vários meses à temperatura ambiente, tempo de fixação até 24 horas

Tabela 26.3 – Continuação.

Solução fixadora	2 g de dicloreto de mercúrio	
Dicloreto de mercúrio	2,5 g de acetato de sódio	
Solução-estoque	Água destilada q.s.p. 200 mL	
Solução fixadora	20 mL de solução-estoque	
Dicloreto de mercúrio	2 mL de formol (formaldeído 40%, p/v)	
Solução de uso		
Solução fixadora de Zenker	5 g de bicloreto de mercúrio	Para dissolver os sais aquecer a solução e mantê-la sob agitação
Solução-estoque	2,5 g de dicromato de potássio	
	1 g de sulfato de sódio	
	Água destilada q.s.p. 1000 mL	
Solução fixadora de Zenker	100 mL de solução-estoque	Tempo de fixação: 2 a 4 horas
Solução de uso	5 mL de ácido acético glacial	
	Para remover depósitos de dicromato: lavar as amostras após fixação em água (1 h) e incubar os cortes após a hidratação com iodo alcoólico a 5% (etanol a 70%) por 3 minutos e com tiosulfato de sódio a 5% por 2 minutos	
Periodato-lisina-paraformaldeído (PLP)	50 mL de paraformaldeído a 3% (p/v)	Ajustar pH para 7,4
	100 mL de ortofosfato de hidrogênio dissódico	
	0,9 g de lisina	
	0,15 g de periodato de sódio	
Paraformaldeído-glutaraldeído	50 mL de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4	Ajustar pH para 7,2
	25 mL de paraformaldeído a 8% (p/v)	
	0,8 mL de glutaraldeído a 25 % (p/v)	
	24,2 mL de água destilada	
Solução de substrato cromógeno (DAB) para peroxidase	10 mg de DAB (diaminobenzidina)	Preparar imediatamente antes do uso
	10 mL de Tris 0,05 M, pH 7,6	Filtrar se necessário
	1 mL de peróxido de hidrogênio a 3%	Manter no escuro
Substrato cromógeno (naftol AS-MX/ fast red) para fosfatase alcalina	2 mg de naftol fosfato AS-MX	Esta solução pode ser mantida a 4°C, porém a manutenção por períodos mais longos (semanas) deve ser a -20°C
	0,2 mL de N,N-dimetilformamida	
	9,8 mL de tris 0,1 M, pH 8,2	
	0,01 mL de levamisole 1 M	

Método Indireto e Imunoenzimático

1. Coletar as amostras rapidamente sobre a placa resfriada (4-7°C, sobre gelo). Lavar o local, o órgão ou tecido rapidamente em uma solução salina tampoadada e pH neutro e em seguida embeber com a solução fixadora. Isolar as partes de interesse e recortar nas dimensões apropriadas (fragmentos de cerca de 1×1×1 cm para embebição em parafina ou 1×1×1 mm para embebição em resinas e observação ao microscópio eletrônico).
2. Prosseguir com a fixação, se possível também gelada (6-24 h).
3. Lavar o material para retirar o excesso de fixador e processá-lo rotineiramente para inclusão em parafina.

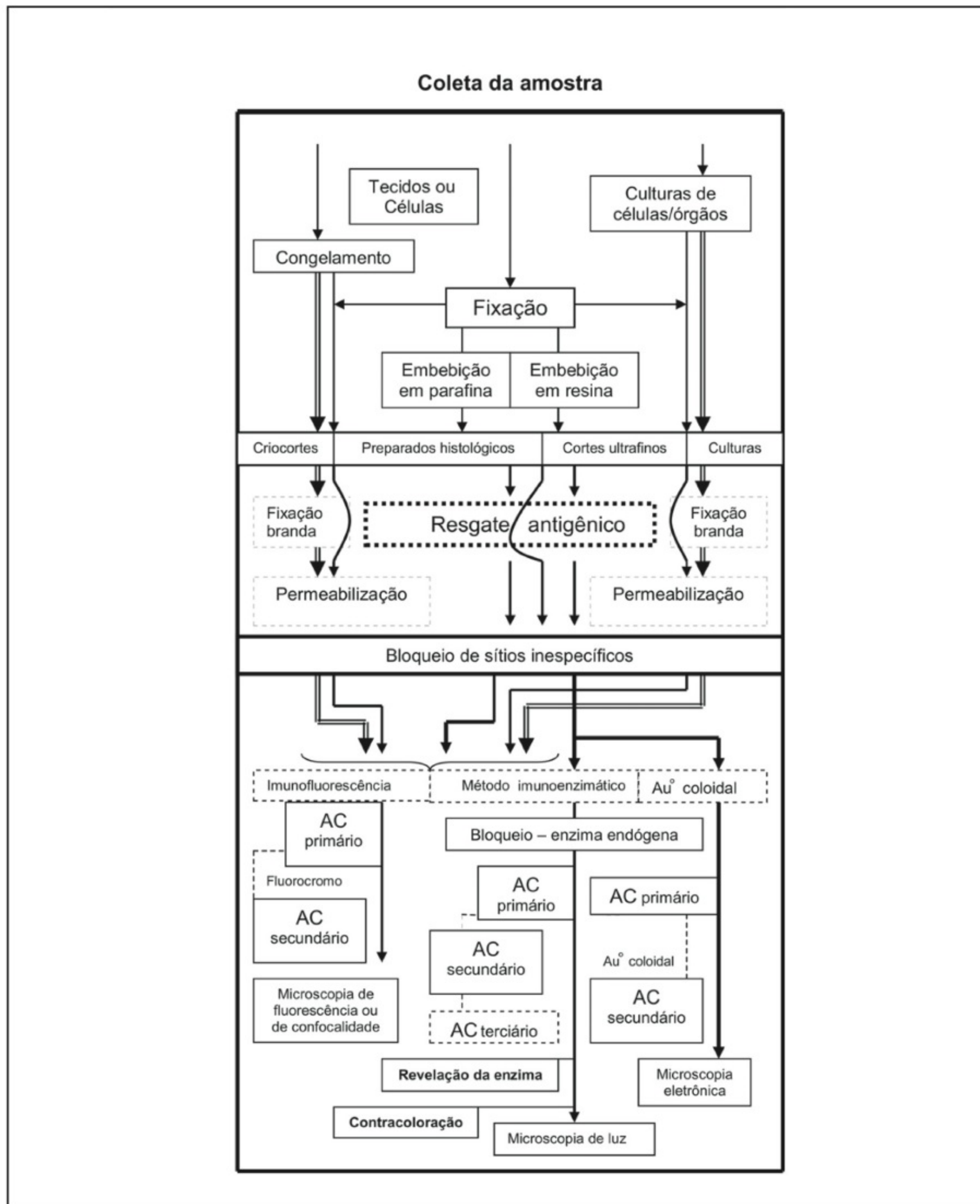


Figura 26.7 – Fluxograma para o processamento das amostras biológicas para a realização de reações imunoisto ou citoquímicas. AC = Anticorpo. Au^o = Ouro.

4. Utilizar cortes obtidos em micrótomo, de aproximadamente 4-5 μm depositados sobre lâminas limpas (etanol-éter) e previamente silanizadas ou umedecidas com poli-L-lisina (10% em água destilada), para facilitar a aderência dos cortes.
5. Desparafinizar as amostras (2 horas em estufa a 58°C seguido de banhos dexilol por 1 a 3 horas), reidratá-las em banhos de etanol em concentrações decrescentes (absoluto, 95%, 80%, 70%) e lavá-las em água corrente.
6. Resgatar o sítio antigênico, se necessário.
7. Permeabilização, se necessário (para culturas de células e ou cortes espessos de congelação) – Triton-100 (0,3% em Tris), saponina (0,05 % em Tris), metanol gelado – 10 minutos.
8. Para eliminar a peroxidase endógena, mergulhar as lâminas em peróxido de hidrogênio a 6% em metanol por 15 minutos. Repetir esta etapa pelo menos duas vezes. Para neutralizar a fosfatase alcalina, mergulhar as lâminas em ácido acético a 8% por 10 minutos.
9. Incubar as amostras em 1% de albumina sérica bovina (BSA) em tampão tris pH 7,6 durante 5-10 min e em seguida incubar as amostras com o soro normal (da mesma espécie em que o anticorpo secundário foi realizado) diluído 1:20, por 30 minutos a 1 hora.
10. Incubar com o anticorpo primário (diluições devem ser testadas 1:25 até 1:200 em uma primeira etapa; temperatura e tempos de incubação: 1 a 2 horas a 37°C ou durante a noite a 4°C) em câmara úmida. Se estiver utilizando o método direto, isto é, um anticorpo primário já conjugado a um marcador, passar para item 14.
11. Lavar em Tris.
12. Incubar com anticorpo secundário conjugado a uma enzima ou à biotina (diluições devem ser testadas: 1:100 até 1:1.000 em Tris-BSA) no mínimo 30 minutos (1 hora a 37° C geralmente oferece bons resultados).
13. Se o anticorpo estiver conjugado a uma enzima passar para item 14. Se o anticorpo estiver conjugado à biotina, incubar com o complexo estreptavidina-biotina-enzima (preparado no momento de uso, conforme instruções do fabricante).
14. Revelar com substrato cromogênico por 5 minutos ou até que a intensidade da reação tenha se desenvolvido adequadamente.

15. Inibir a reação lavando em água corrente.

16. Contracorar (opcional, geralmente a hematoxilina de Mayer oferece excelentes resultados), secar em estufa a 37°C e cobrir com lamínula. Se a reação cromogênica for estável, o material pode ser também desidratado em etanol, passado noxilol e montado com bálsamos ou resinas diversas.

Controles – em parte do material, a incubação com o anticorpo primário (item 10) deve ser substituída por incubação em Tris-BSA e em soro não imune de animal de mesma espécie em que foi obtido o anticorpo primário (1:20). A utilização de amostras sabidamente reativas ou não reativas ao anticorpo primário utilizado, também auxilia a interpretação dos resultados e a adequação do método utilizado.

Cultura de células para reações imunoistoquímicas de culturas de células – as células podem ser cultivadas sobre lamínulas. Retirar as lamínulas do sistema de cultivo, lavar com meio de cultura sem soro, com solução salina tamponada e fixar rapidamente (10 minutos). Siga as etapas acima descritas a partir do item 7. Tomar cuidado ao manipular as lamínulas, geralmente são muito frágeis.

Recuperação Antigênica

O processo de fixação e processamento para inclusão de espécimes pode produzir deformação das biomoléculas celulares e, conseqüentemente, perda de imunorreatividade (Boenisch, 2001). Estas alterações podem ser mais ou menos pronunciadas, dependendo da sensibilidade do antígeno aos agentes a que ele é exposto durante o processamento. Procedimentos que podem minimizar estas alterações e, assim, aumentar a identidade entre antígeno e anticorpo são, em conjunto, denominados de recuperação ou resgate antigênico. Várias metodologias podem ser empregadas para a recuperação antigênica podendo-se utilizar tanto métodos físicos, como o calor, quanto químicos, como a recuperação proteolítica.

Quando se utiliza o calor como meio de recuperação antigênica, os cortes de tecido são submetidos a temperaturas próximas ao ponto de ebulição da água, em meio aquoso. A restauração da imunorreatividade está diretamente relacionada ao tempo de aquecimento e à temperatura a que os cortes são submetidos. O aquecimento pode ser realizado utilizando-se micro-ondas, panela de pressão ou banho-maria, e o tempo a que os cortes são submetidos ao calor varia de 10 a 60 minutos. As soluções (soluções de recuperação) utilizadas durante

o procedimento variam de acordo com as características de cada material e são, em ordem decrescente de utilização, tampão citrato pH 6,0; solução aquosa de EDTA pH 8,0; Tris-EDTA pH 9,0; solução de ácido clorídrico pH 1,0; ácido fórmico pH 2,0; tampão citrato-EDTA pH 6,2; TBS pH 9,0; tampão Tris pH 10,0.

Este procedimento, no entanto, requer alguns cuidados especiais, tais como: 1. a solução de recuperação não deve ferver, o que poderia acarretar em descolamento dos cortes, mesmo quando preparada previamente com poli-L-lisina ou silano; 2. protocolos de tempos longos devem ser cuidados para que o nível da solução de recuperação sempre cubra os cortes; 3. para manter a temperatura da solução de recuperação alta, mas sem ebulição, o aquecimento em micro-ondas deve ser intermitente em vez de contínuo; 4. pelo mesmo motivo, as lâminas podem ser acondicionadas em recipientes contendo a solução de recuperação e este conjunto acondicionado em um recipiente maior contendo água para então ser aquecido em micro-ondas. O calor é de grande importância para reverter os danos causados pela fixação com formalina e pela inclusão em parafina, embora não se saiba ao certo de que modo atua na recuperação da morfologia antigênica. Qualquer

que seja o mecanismo, no entanto, algumas ligações cruzadas devem permanecer intactas (caso contrário, as proteínas seriam desnaturadas pelo calor), enquanto outras devem ser reversíveis, restaurando assim a integridade imunoistoquímica de parte dos antígenos.

Além da recuperação antigênica por meio do calor, podem-se utilizar soluções proteolíticas como a proteinase K, utilizada principalmente para a recuperação de antígenos de membrana, a tripsina, a pepsina, a pronase e a protease.

Atualmente, várias soluções de recuperação antigênica podem ser adquiridas comercialmente prontas para uso, devendo-se seguir as orientações do fabricante.

A maioria dos protocolos de recuperação antigênica é específica para materiais submetidos à técnica de inclusão em parafina e não podem ser utilizados em cortes congelados por serem esses frágeis e extremamente sensíveis ao calor. No entanto, blocos de tecido congelados e fixados em soluções de aldeído podem ser aquecidos em solução de recuperação (frequentemente tampão citrato pH 6,0) e em seguida recongelados em gelo seco. Este procedimento melhora a imunorreatividade antigênica e também diminui possíveis colorações de fundo.

Protocolos de Recuperação Antigênica

Recuperação Antigênica pelo Calor

Quadro 26.1 – Solução utilizada na recuperação antigênica pelo calor

Tampão citrato de sódio (Ácido cítrico 10mm, Tween-20-0,05%, pH 6,0)	2,94 g citrato de sódio diidratado 1.000 mL de água destilada Ajustar pH 6,0 com HCl 1 N e adicionar 0,5 mL de Tween-20	Estoque da solução à temperatura ambiente por 3 meses ou a 4°C por tempos maiores
---	---	---

Procedimento:

- Desparafinizar os cortes histológicos.
- Hidratar em concentrações decrescentes de etanol até água destilada.
- Pré-aquecer a solução de recuperação até 95-100°C em uma cuba de coloração (Quadro 26.1).
- Mergulhar as lâminas nesta solução aquecida e tampar parcialmente a cuba.
- Incubar por 10 a 60 minutos.
- Colocar a cuba contendo as lâminas em temperatura ambiente para permitir o resfriamento por pelo menos 20 minutos.
- Lavar os cortes com o mesmo tampão a ser utilizado durante o restante do procedimento.

Recuperação Antigênica Proteolítica

Quadro 26.2 – Solução utilizada na recuperação antigênica proteolítica.

Proteinase K	Tampão TE	6,10 g de tris-base 0,37 g de EDTA 1.000 mL de água destilada Ajustar pH 8,0 com HCl 10 N	Estocar à temperatura ambiente
	Proteinase K (20×) Solução-estoque	4,0 mg de proteinase K 10 mL de tampão TE pH 8,0	Aliquotar e estocar a -20°C
	Proteinase K (1×) Solução de uso	1 mL de solução-estoque proteinase K (20×) 19 mL de tampão TE pH 8,0	Solução estável por um mês a 4°C ou tempos maiores a -20°C
Tripsina	Tripsina 0,5 Solução-estoque	50 mg de tripsina 10 mL de água destilada	Estocar a -20°C
	Cloreto de cálcio a 1% Solução-estoque	0,1 g de cloreto de cálcio 10 mL de água destilada	Estocar a 4°C
	Tripsina 0,05% Solução de uso	1 mL de solução-estoque de tripsina a 0,5 % 1 mL de solução-estoque de cloreto de cálcio a 1% 8 mL de água destilada	Ajustar pH 7,8 com NaOH 1 N
Pepsina	Pepsina Solução-estoque	100 mg de pepsina 10 mL de HCl a 10 mM pH 2,0	Estocar a 4°C por um mês ou a -20°C por mais tempo
	Pepsina Solução de uso	1 mL de solução estoque de pepsina 1 mL de água destilada	
Pronase	Pronase a 0,05 %	0,005 g de pronase 10 mL de PBS a 0,1 M	Estocar a -20°C
	Pronase a 0,1%	0,01 g de pronase 10 mL de PBS a 0,1 M	
Protease a 0,05%	5 mg de protease 10 mL de água destilada		Ajustar pH 7,8 com NaOH 1 N Estocar a -20°C

Procedimento:

1. Desparafinizar os cortes histológicos.
2. Hidratar em concentrações decrescentes de etanol até água destilada.
3. Cobrir os cortes histológicos com a solução de recuperação antigênica escolhida, por exemplo quadro 26.2.
4. Incubar por 10-20 min a 37°C em câmara úmida.
5. Colocar as lâminas em temperatura ambiente para permitir o resfriamento por pelo menos 10 min.
6. Lavar os cortes com o mesmo tampão a ser utilizado durante o restante do procedimento.

Referências

- Battifora, H. Quality assurance issues in immunohistochemistry. *J Histotechnol.*, 22:169-175, 1999.
- Boenisch, T. Diluent buffer ions and pH: their influence on the performance of monoclonal antibodies in immunohistochemistry. *Appl. Immunohistochem.*, 7:300-306, 1999.
- Boenisch, T. Formalin-fixed and heat-retrieved tissue antigens: a comparison of their immunoreactivity in experimental antibody diluents. *Appl. Immunohistochem.*, 9:176-179, 2001.
- Bullock, G.R. Petrusz P. (eds.) *Techniques in Immunocytochemistry*. Vol 1. Academic Press, San Diego, California. 1989.
- Cattoretti, G.; Pileri, S.; Parravicini, C.; Becker, M.H.G.; Pogi, C.; Bifulco, G. et al. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin embedded tissues sections. *J. Pathol.*, 171:83-98, 1993.
- Coons, A.H.; Kaplan, M.H. Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Exp. Med.*, 91:1-13, 1950.
- Davies, D.R.; Padlan, E.A.; Sheriff, S. Antibody-antigen complexes. *Annu. Rev. Biochem.*, 59:439-473, 1990.
- Faulk, W.; Taylor, G. An Immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochimistry* 8:1081-1083, 1971.
- Fegurson, D.J.P.; Hughes, D.A.; Beesley E. Immunogold probes in electron microscopy. In: *Methodos in Molecular Biology*, vol. 80: Immunohistochemical Protocols 2nd ed. Ed. Pound J.D.. Humana Press, Totowa, NJ. pp. 297-318, 1998.
- Frost, A.R.; Sparks, D.; Grizzle, W.E. Methods of antigen recovery vary in their usefulness in unmasking specific antigens in immunohistochemistry. *Appl. Immunohistochem* 8:236-243, 2000.

- Giorno, R. A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. *Diagn. Immunol.*, 2:161-166, 1984.
- Iczkowski, K.A.; Cheng, L.; Crawford, B.G.; Bostwick, D.G. Steam heat with an EDTA buffer and protease digestion optimizes immunohistochemical expression of basal cell-specific antikeratin 34betaE12 to discriminate cancer in prostatic epithelium. *Mod. Pathol.*, 12:1-4, 1999.
- McLean, I.W.; Nakane, P.K. Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, 22:1077-1083, 1974.
- Milde, P.; Merke, J.; Ritz, E.; Haussler, M.R., Rauterberg E.W. Immunohistochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors and estrogen receptors by monoclonal antibodies: comparison of four immunoperoxidase methods. *J. Histochem. Cytochem.*, 37:1609-1617, 1989.
- Mitchell, D.; Ibrahim, S.; Gusterson, B.A. Improved immunohistochemical localization of tissue antigens using modified methacarn fixation. *J. Histochem. Cytochem.*, 33:491-495, 1985.
- Miller, R.T.; Swanson, P.E.; Wick, M.R. Fixation and epitope retrieval in diagnostic immunohistochemistry: a concise review with practical considerations. *Appl. Immunohistochem.*, 8:228-235, 2000.
- Montero, C. The antigen-antibody reaction in immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, 51:1-4, 2003.
- Nagle, R.B.; Clark, V.A.; McDaniel, K.M.; Davis, J.R. Immunohistochemical demonstration of keratins in human ovarian neoplasms. A comparison of methods. *J. Histochem. Cytochem.*, 31:1010-1014, 1983.
- Oros, J.; Matsushita, S.; Rodriguez, J.L.; Rodriguez, F.; Fernandez, A. Demonstration of rat CAR bacillus using a labelled streptavidin biotin (LSAB) method. *J Vet Med Sci* 58:1219-1221, 1996.
- Polak, J.M.; Van Noordien S. (eds.). *Immunocytochemistry: Modern Methods and Applications*. Bristol, Wright, 1986.
- Pound, D.J. *Immunohistochemical Protocols*. 2nd ed. Humana Press. Totowa. New Jersey, 1998.
- Puchtler, H.; Meloan, S.N. On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochemistry* 82:201-204, 1985.
- Renshaw, S. *Immunohistochemistry*. Scion Publishing, 2006, 264 p.
- Shi, S.-R.; Cotea, R.J.; Taylor, C.R. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, present, and future. *J. Histochem. Cytochem.*, 45:327-344, 1997.
- Shi, S.-R.; Liu, C.; Taylor, C.R. Standardization of immunohistochemistry for formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen-retrieval technique: from experiments to hypothesis. *J. Histochem. Cytochem.*, 55:105-109, 2007.
- Shi, S.-R.; Key, M.E.; Kalra, K.L. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.*, 39:741-748, 1991.
- Shi, Z.R.; Itzkowitz, S.H.; Kim, Y.S. A comparison of three immunoperoxidase techniques for antigen detection in colorectal carcinoma tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 36:317-322, 1988.
- Taylor, C.R.; Shi, S.-R.; Barr, N.J.; Wu, N. Techniques of immunohistochemistry: principles, pitfalls, and standardization. In: Dabbs D.J., eds. *Diagnostic Immunohistochemistry*. New York: Churchill Livingstone, NY 2002
- Volk, H.; Potschka, H.; Loscher, W. Immunohistochemical localization of P-glycoprotein in rat brain and detection of its increased expression by seizures are sensitive to fixation and staining variables. *J. Histochem. Cytochem.*, 53: 517-531, 2005.
- Wilson, J.E. The use of monoclonal antibodies and limited proteolysis in elucidation of structure-function relationships in proteins. In: *Methods of Biochemical Analysis*. Suelter, C.H., ed. New York, NY: John Wiley & Sons, NY 1991, pp. 207-250.

27. Análise Proteômica: Identificação de Proteínas Extraídas de Géis de Eletroforese Bidimensional Utilizando a Espectrometria de Massas

Michael Murgu

Introdução

Nos últimos anos, várias espécies de organismos, incluindo bactérias, vírus e o próprio ser humano tiveram seus genomas inteiros ou parcialmente sequenciados, e essa grande quantidade de dados vem sendo depositada em bases de dados digitais, muitas delas acessíveis via Internet gratuitamente. Entretanto, a informação obtida a partir do genoma não tem grande aplicação no estudo de doenças e tratamentos, pois o DNA não é alterado em diferentes condições de um organismo, como, por exemplo, um tecido doente e um sadio.

O proteoma, definido como o complemento de proteínas expresso por um genoma em uma célula ou tecido (Wasinger et al., 1995), é um sistema altamente dinâmico, sujeito a condições do meio. A análise proteômica visa estudar as variações quantitativas da expressão dessas proteínas em diferentes condições e a aplicação desses dados na descoberta de novas drogas, diagnósticos e terapias. Esse estudo é feito em relação a todas as proteínas de um organismo, e não em relação a proteínas individuais, o que diferencia a técnica da química de proteínas tradicional, ainda que várias ferramentas de análise sejam comuns às duas áreas de estudo. Enquanto a química de proteínas visa à obtenção de informações detalhadas em relação a proteínas específicas, como a conformação e as interações, a análise proteômica visa basicamente a identificação e à quantificação de proteínas, sendo feita por técnicas de larga escala para um grande número de proteínas em pouco tempo.

Estudos comparativos de tecidos de organismos normais, doentes e tratados leva à informação de quais proteínas se expressam de forma diferente nestes vários

estados do organismo e que podem estar associadas com os sintomas, e também serem utilizadas para diagnóstico de doenças, acompanhamento de tratamentos e como alvos moleculares no desenvolvimento de drogas.

A análise proteômica é muito mais complexa que a genômica, devido a vários fatores, alguns deles listados a seguir.

- Em uma única célula, podem estar presentes de centenas a milhares de diferentes proteínas.
- Essas proteínas podem estar presentes em concentrações muito diferentes entre si, em quantidades que podem variar desde uma única unidade de uma proteína até quantidades acima de 10^8 unidades em uma célula.
- Proteínas podem apresentar características estruturais e físico-químicas muito distintas – algumas proteínas são ácidas, outras básicas, algumas são grandes, outras pequenas, algumas são hidrofílicas, outras hidrofóbicas.

Essa diversidade química encontrada nas proteínas dificulta as etapas de extração, solubilização, separação e análise estrutural, mas por outro lado é a base para as técnicas de separação mais utilizadas.

Uma das estratégias de estudo mais utilizadas na análise proteômica envolve a **eletroforese bidimensional**, que permite a separação e a quantificação de um grande número de proteínas, a **espectrometria de massas**, utilizada para a análise da estrutura primária de proteínas a partir de pequenas quantidades de material (obtidas a partir de *spots* de proteínas de gel 2D), e a **bioinformática**, que permite a identificação de proteínas a partir de dados de espectrometria de massas,

associando-os à informação presente em bases de dados de proteínas e DNA.

Existem outras diferentes estratégias para o estudo de proteomas, que incluem várias técnicas de separação de proteínas, como a cromatografia líquida multidimensional. Existem também diferentes técnicas de identificação de proteínas, a maioria delas baseada em espectrometria de massas e bioinformática. Algumas destas estratégias envolvem a identificação de proteínas a partir do sequenciamento por espectrometria de massas de peptídeos de digestão enzimática separados por cromatografia líquida multidimensional (Wolters et al., 2001). Essas técnicas não serão vistas em detalhes neste capítulo, no qual é focada a estratégia mais simples e estabelecida de eletroforese bidimensional/espectrometria de massas.

A eletroforese bidimensional permite a separação de um grande número de proteínas, graças à utilização de dois mecanismos de separação totalmente distintos, a focalização isoeletrica, que separa proteínas por ponto isoeletrico (pI) em tiras de gel com gradiente de pH, e SDS-PAGE, que separa as proteínas por sua massa molar relativa (Mr). Dessa forma, após a separação e coloração do gel, um número entre dezenas a milhares de pontos, conhecidos por *spots*, são observados, cada um representando, a princípio, uma única proteína.

Embora neste capítulo não sejam apresentadas as etapas de preparação do gel de eletroforese bidimensional, estas são extremamente importantes, desde a coleta, extração e preparação da amostra até a coloração do gel, para garantir que as proteínas observadas realmente representem o perfil de expressão do tecido ou célula na condição estudada, tanto qualitativa quanto quantitativamente. Essas etapas estão descritas com mais detalhe no capítulo 24.

Etapas de Processamento de *Spots*

As etapas de processamento de amostra a partir do gel de eletroforese bidimensional são mostradas na figura 27.1.

A primeira etapa após a separação das proteínas por eletroforese bidimensional é a análise do gel, feita com utilização de *softwares* especializados a partir da imagem do gel obtida em um *scanner* ou câmera digital. Estes *softwares* permitem a detecção de *spots*, a determinação de valores de pI e massa molar de cada proteína, a comparação do perfil de *spots* de diferentes géis, a quantificação de proteínas e a seleção de *spots* para análises posteriores visando à identificação de proteínas. A seleção de *spots* para

análises posteriores vai depender do objetivo do estudo, sendo que todos os *spots* podem ser selecionados para a determinação de mapas proteicos de um organismo, ou então *spots* selecionados a partir de certos parâmetros, como a expressão diferencial em condições diferentes do organismo, para estudos mais específicos.

As etapas experimentais de processamento de amostras a partir do gel mostradas na figura 27.1 são:

- **Extração de *spots*** selecionados do gel, que são cortados do gel e transferidos para recipientes individuais (microplacas ou microtubos de centrífuga).
- **Descoloração dos *spots***, feita por lavagens dos *spots* com soluções que vão depender do corante utilizado.
- **Digestão enzimática**, feita na maioria das vezes com tripsina, que rompe a proteína de forma específica no lado C-terminal dos aminoácidos lisina e arginina, ou outra enzima que apresente atividade bastante específica.
- **Extração dos peptídeos de digestão do gel**, feita por lavagens com solução com alta concentração de solvente orgânico (geralmente acetonitrila ou metanol). O menor tamanho dos peptídeos em relação às proteínas permite que eles sejam extraídos do gel por eluição com solventes. Proteínas intactas só podem ser extraídas do gel por eletroeluição ou então com o uso de soluções que rompam a estrutura do gel (Scheer e Ryan, 2001; Galvani et al., 2001).

As etapas descritas acima podem ser feitas manualmente ou então com a utilização de equipamentos para a automação deste processo. A automação desse processo é altamente recomendada devido a vários fatores, como o grande número de etapas experimentais, grande número de amostras geralmente analisadas em estudos de proteoma, possibilidade de contaminação (principalmente por queratina) e reprodutibilidade. Existem vários tipos de sistemas para automação desse processo, que vão desde equipamentos que fazem etapas do processo, como a retirada de *spots* ou digestão enzimática, até equipamentos para automação total do processo, fazendo a extração de *spots*, descoloração, digestão enzimática, extração de peptídeos e preparação das amostras para análise por espectrometria de massas por MALDI-ToF. Utilizando-se sistemas de automação completa, colocam-se os géis e a lista de coordenada dos *spots* de interesse no equipamento e retiram-se as lamínas prontas para análise por MALDI dos peptídeos de digestão enzimática em um processo totalmente automatizado, sem perigo de erros manuais e com alta reprodutibilidade para um grande número

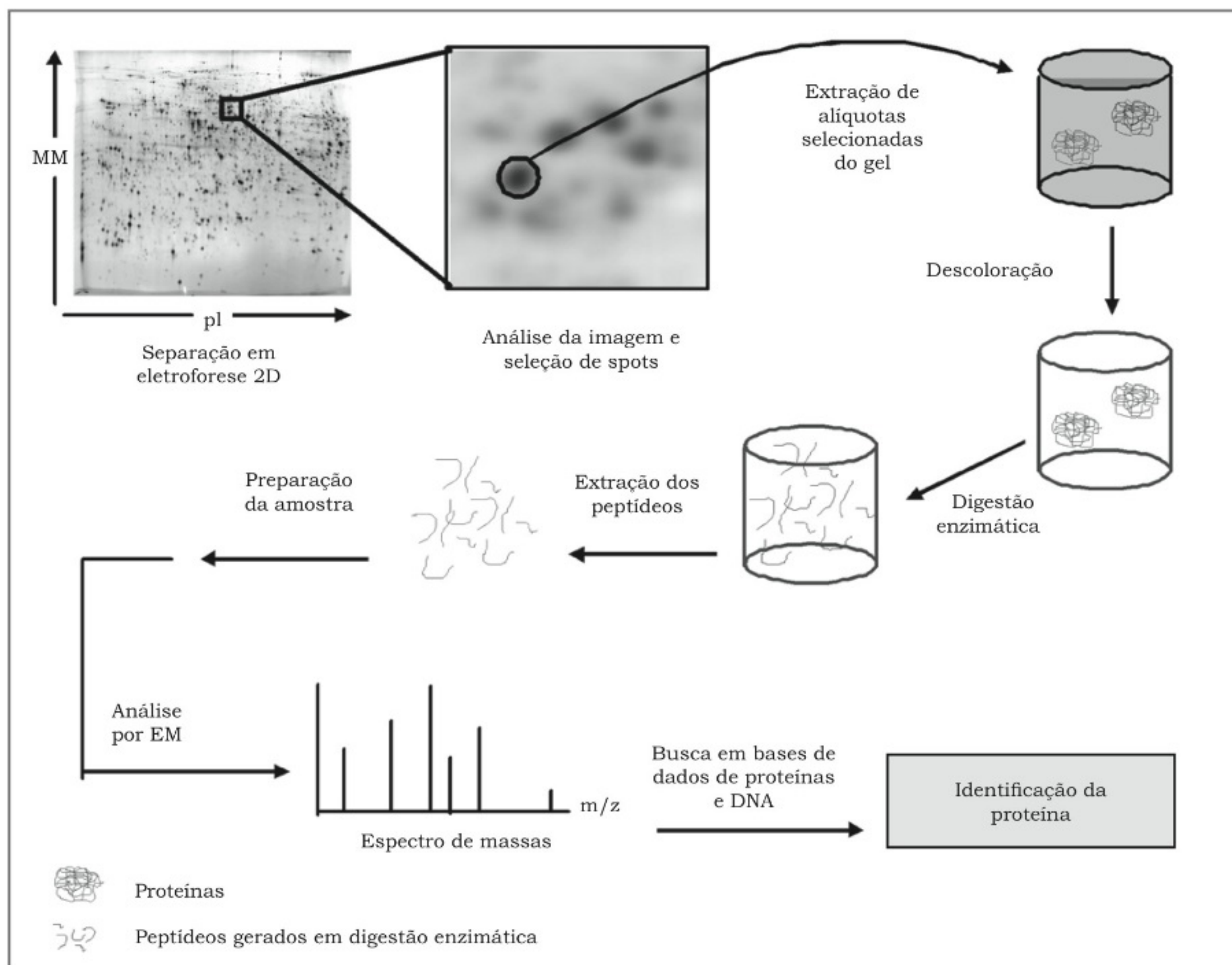


Figura 27.1 – Etapas de processamento de *spots* na identificação de proteínas utilizando espectrometria de massas e buscas em bases de dados. Os *spots* de proteínas de um gel 2D podem ser recortados do gel, e submetidos às etapas de descoloração, digestão enzimática em gel e extração dos peptídeos do gel. Os peptídeos resultantes da digestão enzimática são submetidos a análises por espectrometria de massas para a identificação da proteína por comparação dos dados com bases de dados de proteínas e DNA.

de amostras. Um exemplo é a Ettan Spot Handling Workstation (GE Healthcare), que faz todo o processo com o auxílio de um robô para transferências de géis e microplacas de um módulo de processamento (extrator de *spots*, digestor etc.) a outro. Esses equipamentos já vêm com protocolos otimizados, que podem, entretanto, ser modificados de acordo com as necessidades dos pesquisadores. Uma outra vantagem da automação é o rastreamento de amostras, pois os sistemas geram relatórios que facilitam a associação de proteínas identificadas por espectrometria de massas com os respectivos *spots* dos quais elas foram extraídas.

Essas etapas também podem ser feitas manualmente, mas com extremo cuidado, em um ambiente livre de

contaminação e vão depender bastante da habilidade do pesquisador que trata as amostras.

Abaixo são descritos os procedimentos para extração de *spots* do gel 2D e digestão enzimática feita manualmente. Esses procedimentos são descritos por Westmeier e Naven (2002).

Procedimento para Extração de *Spots*

O principal cuidado a ser tomado na extração manual de *spots* é em relação à contaminação, e um dos cuidados é fazer esta etapa em um ambiente limpo e sem o perigo de contaminação por poeira, como por exemplo uma capela de fluxo laminar. A introdução

da queratina na etapa de extração de *spots* faz com que ela passe por todas as etapas seguintes, ou seja, digerida, os peptídeos de digestão desta vão gerar sinais no espectro de massas que vão atrapalhar ou até impossibilitar a identificação da proteína sendo estudada. Devem-se também utilizar luvas sem talco (*powder free*) no procedimento e lavar os recipientes em que serão depositadas as amostras de gel com água ultrapura ou bidestilada para retirar partículas de poeira que podem conter queratina.

Outra possibilidade de contaminação é a cruzada, ou seja, a contaminação de um *spot* por resíduos de gel de outro. Embora esses resíduos ocorram em pequena quantidade, não comprometendo as análises na maioria das vezes, podem ocorrer problemas quando um *spot* com pequena quantidade de proteínas é contaminado por resíduos de um outro com alta concentração de proteínas. Para evitar isso, devem-se limpar os instrumentos (lâmina, agulha etc.) utilizados na manipulação do gel entre cada *spot* extraído.

Procedimento Manual

Cortar em volta do *spot* da proteína de interesse utilizando uma lâmina. Tentar cortar o mínimo possível de gel fora do *spot*. Utilizando uma agulha cirúrgica, transferir o pedaço de gel cortado para um recipiente (geralmente um microtubo de 500 μ L ou microplaca) previamente enxaguado com água deionizada.

Descoloração do Gel

A descoloração do gel é uma etapa importante do processamento do gel, pois vai garantir que substâncias presentes nestes corantes não interfiram nas etapas de digestão enzimática e análise por espectrometria de massas. O protocolo para descoloração do gel depende do corante utilizado. Os três métodos mais comuns para coloração são: *Coomassie Brilliant Blue* (CBB), prata e fluorescência (Deep Purple, Sypro Ruby).

Descoloração de Géis Corados com CBB e Fluorescência

O principal problema em relação à presença de CBB em análise proteômica é que este causa forte supressão de sinal tanto em MALDI como em ESI. Embora não interfira na etapa de digestão, sua remoção é muito mais fácil de ser feita antes do que depois da digestão. Após a digestão, o CBB é concentrado juntamente com os peptídeos de digestão na etapa de extração, sendo difícil de ser removido por purificação em microescala. O

procedimento de descoloração é o mesmo para CBB e fluorescência.

Procedimento

Adicionar 25 μ L de solução 75 mmol/L de bicarbonato de amônio em etanol: água (40:60-v/v) ao pedaço de gel. Agitar em um equipamento vórtice e deixar em repouso. O sobrenadante irá rapidamente se tornar azul. Remover o sobrenadante após 10 minutos e adicionar uma nova alíquota da solução descolorante até o gel estar totalmente descolorido. O tempo necessário para a descoloração vai depender da intensidade da coloração. Após a remoção do sobrenadante, o gel estará pronto para a etapa de digestão.

Descoloração de Géis Corados com Prata

O método de coloração por prata precisa ser compatível com a análise por espectrometria de massas. Os métodos de coloração por prata mais sensíveis, para a detecção de 1-10 ng por *spot* de proteína, requerem o uso de glutaraldeído. Entretanto, o glutaraldeído reage com os grupos amino das proteínas, tanto os ϵ -amino (da cadeia lateral da lisina) como α -amino, e com isso liga a proteína ao gel. Por isso, quando se deseja utilizar o gel para análise por espectrometria de massas, o glutaraldeído, assim como o formaldeído devem ser excluídos do processo, o que causa perda de sensibilidade do método.

Procedimento

Preparar soluções frescas de ferricianato de potássio (30 mmol/L) e tiosulfato de sódio (100 mmol/L).

Preparar uma solução 1:1 dos reagentes acima e adicioná-la aos *spots* em quantidade suficiente para cobri-los.

Assim que a coloração for removida, lavar o *spot* com água.

Equilibrar o *spot* com bicarbonato de amônio (200 mmol/L) por 15 minutos, remover o sobrenadante e repetir essa etapa mais uma vez. O gel estará então pronto para a etapa de digestão.

Digestão de Proteínas em Gel

Instrumentação

- Bloco de aquecimento.
- Banho de ultrassom.

Reagentes

- Ditiotreitól (DTT).

- Iodoacetamida.
- Tripsina (*Sequence grade*).
- Bicarbonato de amônio.
- TFA.
- Acetonitrila (ACN).
- Água deionizada.

Protocolo

Observação: As etapas de redução e alquilação não necessitam ser feitas quando as amostras vieram de um gel de eletroforese bidimensional, pois estas foram feitas na etapa de equilíbrio realizada entre a focalização isoeletrica e a SDS-PAGE.

Redução

Adicionar 10 μ L de solução de ditioneitol, DTT (5 mM em 25 mM de bicarbonato de amônio), à fatia de gel (ou quantidade suficiente para cobrir o pedaço de gel) e manter por 30 minutos a 60°C.

Alquilação

Adicionar 10 μ L de solução de iodoacetamida (55 mM em 25 mM de bicarbonato de amônio) à fatia de gel e manter por 30 minutos no escuro à temperatura ambiente.

Remover o sobrenadante, lavar com bicarbonato de amônio 25 mM, remover o sobrenadante e lavar com acetonitrila.

Corte do gel em pequenos pedaços

Pressionando o pedaço de gel com uma agulha cirúrgica para mantê-lo no lugar, cortá-lo em pedaços menores utilizando uma lâmina (2-4 mm²).

Desidratação

Desidratar o pedaço de gel com acetonitrila (3 x 25 μ L, 10 minutos cada). Os pedaços de gel começarão a ficar brancos, sendo que estarão completamente brancos após as 3 lavagens. Secar o gel em um sistema a vácuo (centrífuga com sistema a vácuo) ou câmara de secagem, até ele parecer como poeira.

Reidratação

Aplicar a solução de enzima em tampão (10 μ L a 40 ng/ μ L em 50 mM de bicarbonato de amônio) ao gel e mantê-lo resfriado em gelo por 45 minutos.

Digestão

Após 45 minutos, remover o sobrenadante e adicionar solução de tampão (sem a enzima) para cobrir os pedaços de gel.

Manter a 30°C por 1 hora e *overnight* (uma análise por *peptide mass fingerprint* preliminar pode ser obtida após 1 hora coletando-se uma alíquota da mistura de digestão).

Extração

Adicionar 20 μ L de bicarbonato de amônio 50 mM e colocar no banho de ultrassom por 10 minutos. Adicionar 20 μ L de acetonitrila/5% TFA (1:1) e colocar no banho de ultrassom por 10 minutos. Transferir o sobrenadante para um tubo separado. Repetir o procedimento três vezes.

Adicionar 10 μ L de acetonitrila e colocar no banho de ultrassom. Juntar o sobrenadante aos anteriores.

Preparação da Amostra e Análise por Espectrometria de Massas

As etapas de preparação de amostras para espectrometria de massas vão depender do tipo de equipamento que será utilizado, pois para *electrospray* a amostra é analisada em solução e por MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) a partir de cristais formados junto com a matriz.

Uma amostra perfeita para a análise por espectrometria de massas seria composta apenas pelos peptídeos de digestão enzimática. Entretanto, vários contaminantes podem estar presentes em amostras obtidas a partir de um gel de eletroforese bidimensional ou cromatografia, como sais, corantes, detergentes etc. Esses contaminantes podem interferir no resultado da análise e, dependendo da quantidade presente, até impossibilitar a análise. Muitas vezes, procedimentos para a remoção de contaminantes devem ser utilizados para a obtenção de bons resultados. Os procedimentos mais comuns são diálise e etapas cromatográficas em microescala.

MALDI é uma técnica mais robusta do que ESI em relação à presença de contaminantes, entretanto mesmo em MALDI muitas vezes os procedimentos de purificação da amostra se tornam necessários.

Os métodos de tratamento da amostra podem ser otimizados para a redução de contaminantes na amostra final, como por exemplo, por meio da utilização de sais voláteis (bicarbonato de amônio) na preparação dos tampões de extração de corantes e digestão enzimática.

Análise de Proteínas por Espectrometria de Massas

Proteínas e peptídeos são formados por aminoácidos, e a sequência em que estão ligados consiste na estrutura primária destas biomoléculas. Existem várias formas de identificação de proteínas, como, por exemplo, a comparação com padrões em géis de eletroforese ou cromatografia líquida, *Western blotting*, análise da composição de aminoácidos, sequenciamento N-terminal de Edman etc. Essas técnicas podem ser divididas naquelas que permitem a identificação de proteínas conhecidas por meio de ensaios específicos ou por comparação de dados experimentais com padrões ou bases de dados, e em técnicas que permitem o sequenciamento de uma proteína desconhecida (sequenciamento *de novo*). A espectrometria de massas é uma técnica que tem mostrado grande eficiência tanto na identificação de proteínas conhecidas como no sequenciamento de peptídeos.

Nos últimos anos, a espectrometria de massas ganhou grande aceitação na análise de proteínas devido a alta **sensibilidade** da técnica, que permite a realização de experimentos a partir de pequenas quantidades de proteína (na ordem de fmol), a **velocidade de análise**, a **capacidade de automação** e a **utilização de bases de dados de proteínas e DNA para identificação de proteínas** a partir dos dados obtidos por espectrometria de massas. A identificação de proteínas baseia-se em medidas de massa molar de proteínas, peptídeos e fragmentos gerados a partir destas espécies. A massa molar está relacionada diretamente com a composição de aminoácidos destas espécies, característica de cada proteína.

MALDI e *electrospray* são as técnicas mais utilizadas na análise de peptídeos e proteínas. A técnica MALDI é muitas vezes a primeira opção para a análise proteômica, devido à facilidade na aquisição e interpretação de dados, menor tempo de análise e maior possibilidade de automação.

Existem três tipos principais de experimentos com proteínas feitos por espectrometria de massas:

1. Determinação da massa molecular – análise da proteína intacta pode ser feita por MALDI ou ESI.
2. Identificação de proteínas por *Peptide Mass Fingerprint* – identificação de proteínas por comparação das massas dos peptídeos formados em digestão enzimática de uma proteína com bases de dados.
3. Sequenciamento de peptídeos – feito por técnicas como ESI/MS/MS ou MALDI-PSD que permitem

a seleção de íons e análise de seus fragmentos e levam à determinação da sequência de aminoácidos. Essas sequências parciais podem também ser comparadas com bases de dados e levar à identificação da proteína.

Princípios Básicos de Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas baseia-se no princípio de que íons em fase gasosa podem ser direcionados e separados de acordo com sua relação massa/carga (m/z) por campos elétricos e magnéticos ou por diferenças na velocidade. A técnica permite a obtenção de informação estrutural e de massa molar de uma substância a partir de espectros em que são registrados picos relativos a m/z de cada íon e à intensidade de cada um destes picos.

O equipamento utilizado nestas análises é conhecido como espectrômetro de massas. Existem diferentes tipos de espectrômetros de massas, e em cada um deles substâncias com certas características (principalmente em relação a polaridade, massa molar e volatilidade) poderão ou não ser analisadas. A figura 27.2 mostra o diagrama dos principais componentes de um espectrômetro de massas.

A amostra é introduzida no equipamento através de um **sistema de inserção** e direcionada à **fonte de íons**, no qual as moléculas da amostra são ionizadas, ou seja, ganham carga elétrica, pela adição ou remoção de prótons (íons H^+) no caso de biomoléculas. Os íons formados são então direcionados por campos elétricos e magnéticos ao **analisador**, que separa ou filtra os íons de acordo com a relação massa/carga (m/z). Estes íons alcançam o **detector** gerando um sinal que é enviado ao **sistema de aquisição de dados**, que após ser processado gera o espectro de massas correspondente.

No diagrama são mostradas as principais partes que compõem um espectrômetro, e para cada uma delas existem opções, algumas delas apresentadas na figura. A configuração de um equipamento vai depender do tipo de aplicações (tipos de moléculas a serem analisadas, limite de massas, resolução etc.) nas limitações e no preço final do equipamento. Apesar de praticamente qualquer tipo de substância poder ser analisada por espectrometria de massas, não existe equipamento que possa analisar qualquer tipo de molécula.

A análise de proteínas e peptídeos utilizando espectrometria de massas só foi possível a partir da década de 1980, com o desenvolvimento das técnicas de ionização MALDI (Karas e Hillenkamp, 1988) e *electrospray* (Fenn et al., 1989). Essas técnicas permitem a formação

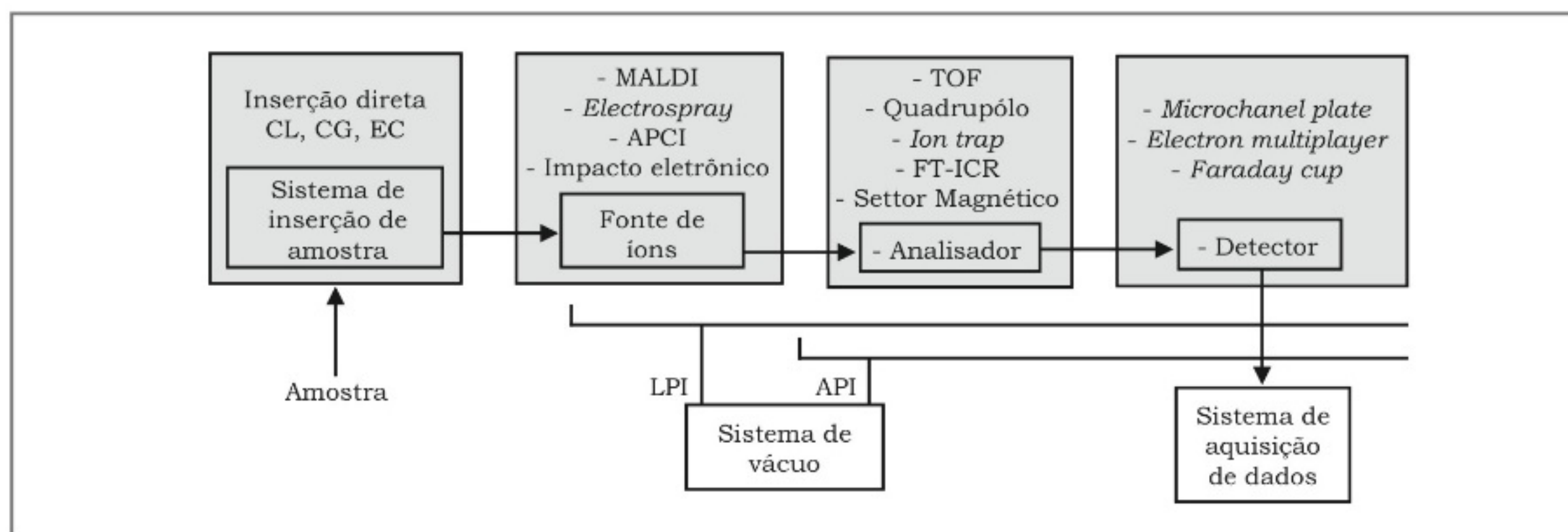


Figura 27.2 – Diagrama de um espectrômetro de massas. Em um espectrômetro de massas, os íons formados na fonte são separados de acordo com a relação massa/carga (m/z) no analisador e direcionados ao detector que registra o sinal para gerar o espectro de massas. CL = cromatografia líquida; CG = cromatografia gasosa; EC = eletroforese capilar; MALDI = *matrix assisted laser desorption/ionization*; APCI = *atmospheric pressure chemical ionization*; ToF = *time of flight*; FT-ICR = *fourier transform ion cyclotron resonance*; LPI = *low pressure ionization*; API = *atmospheric pressure ionization*.

de íons em fase gasosa a partir destas biomoléculas, sem que ocorra degradação.

MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*)

Como sugerido pelo nome, em MALDI a ionização das moléculas é feita por laser com o auxílio de uma **matriz**. Essa matriz consiste em moléculas de baixa massa molar (geralmente abaixo de 300 Da) que têm a capacidade de formar cristais juntamente com a amostra a ser analisada. Os cristais formados podem absorver a energia do laser e ionizar as moléculas por transferência de prótons (H^+), gerando íons positivos do tipo MH^+ . A figura 27.3 mostra a estrutura química de algumas das matrizes mais comuns na análise de proteínas e peptídeos, como o ácido α -ciano-hidroxicinâmico, geralmente utilizado na análise de peptídeos, e o ácido sinapínico,

utilizado na análise de proteínas. As estruturas químicas destas moléculas apresentam um anel aromático que absorve a energia do *laser*, e um grupo ácido, que permite a ionização das substâncias analisadas por transferência de próton. A matriz 2,4,6-tri-hidroxi-acetofenona tem a propriedade de, ao contrário das outras três, aceitar um próton, sendo utilizada para a formação de íons negativos.

A preparação da amostra é fundamental para o sucesso de uma análise, pois a formação dos cristais é uma etapa crítica de uma análise por MALDI, e vários fatores, como a presença de contaminantes (principalmente sais) e a relação proteína (peptídeo)/matriz, devem ser considerados na preparação da amostra. Existem vários diferentes protocolos para a preparação de amostras para MALDI, e a escolha do método vai depender de vários fatores, como a concentração e a solubilidade da amostra. Os cristais são formados na superfície de

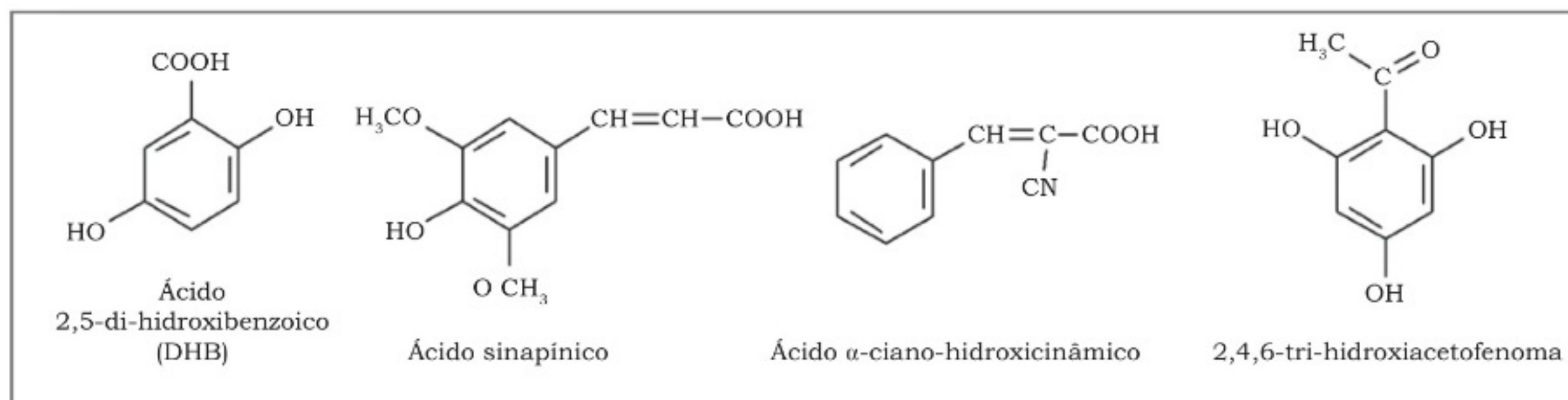


Figura 27.3 – Estruturas químicas de algumas matrizes utilizadas em MALDI.

lâminas de aço que são posteriormente inseridas na fonte de ionização MALDI para análise. A matriz ácido α -ciano-hidroxicinâmico é a mais utilizada na análise de peptídeos de digestão enzimática em análise proteômica devido à alta sensibilidade nas análises e à formação de uma camada uniforme na lâmina de MALDI, o que a torna adequada à automação das etapas de preparo de amostras e análises (Beavis et al., 1992).

Quando o laser incide sobre os cristais, de forma pulsada, a matriz absorve a energia do laser e isso causa a volatilização da matriz. A matriz está presente em uma concentração muito maior do que as moléculas analisadas, de forma que proteínas de alta massa molar (> 300.000 Da) podem ser volatilizadas sem se degradarem, pois são arrastadas à fase gasosa pelas moléculas da matriz. Nesta nuvem de moléculas formada ocorrem as transferências de prótons que levam à formação de íons em fase gasosa, que são então acelerados ao analisador por tempo de voo (ToF) por um forte campo elétrico (~ 20 kV). Esse processo é mostrado na figura 27.4.

Os íons formados na fonte, ao serem acelerados, atingem velocidades que vão depender da relação massa/carga de cada íon, e esse é o princípio da separação de íons em um analisador por tempo de voo (*time of flight*, ToF). Considerando que a energia de aceleração dos íons é a mesma e que a velocidade é proporcional à massa e à aceleração, quanto menor a massa de um íon (na verdade, a relação massa/carga), maior será a velocidade deste íon. Dessa forma, os íons acelerados na fonte, ao atravessarem um tubo em que não são sujeitos a campos

elétricos ou magnéticos (conhecido como tubo de voo) serão separados devido a diferentes velocidades. Ao final deste tubo encontra-se o detector de íons, que vai então registrar o tempo que cada íon levou para atravessá-lo, e a intensidade do sinal é relacionada ao número de íons que atinge o detector em cada instante. Esse processo é mostrado na figura 27.5. Essa configuração de sistema é conhecida como MALDI-ToF linear, e tem grande aplicação na análise de proteínas de alta massa molecular, pois, a princípio, não existe limite de massas para a detecção linear, e proteínas com massas molares acima de 300 kDa podem ser analisadas.

Nas análises de proteínas por MALDI-ToF, além do íon molecular protonado, outros tipos de íons podem ser observados, como íons com duas ou três cargas, e também conjugados da proteína, como dímeros e trímeros. A figura 27.6 mostra o espectro da proteína albumina sérica bovina (BSA), no qual pode-se observar, além do íon molecular protonado em m/z 66.000 ($[BSA + H]^+$), um íon em m/z 33.000 ($[BSA + 2H]^{++}$) gerado a partir do íon com duas cargas, e outros dois em m/z 132.000 ($[2 BSA + H]^+$) e 197.000 ($[3 BSA + H]^+$), representando, respectivamente, o dímero e o trímero de BSA.

Quando peptídeos são analisados, é importante que o sistema seja capaz de separar diferenças mínimas de massas para a diferenciação de aminoácidos com massa semelhante. Para isso, o sistema de análise linear não é muito eficiente, pois na maioria das vezes o sinal obtido não apresenta resolução necessária para diferenciação de aminoácidos com pequenas diferenças de massas.

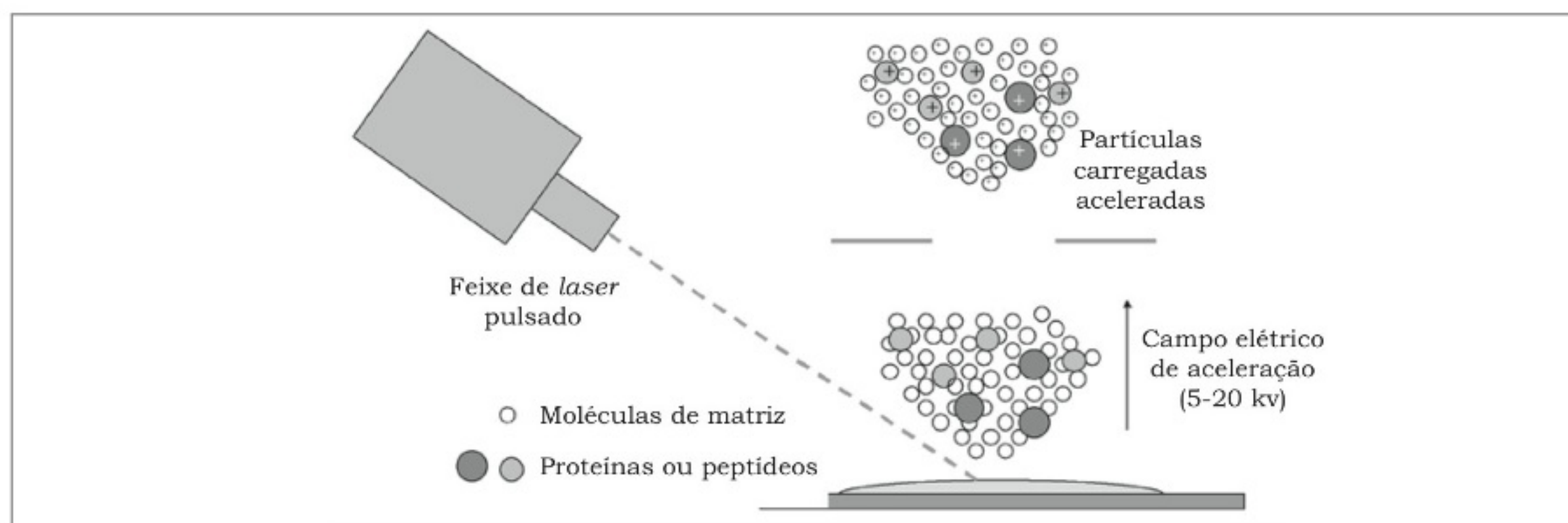


Figura 27.4 – Processo de ionização em uma fonte de MALDI. O laser incide de forma pulsada sobre os cristais de matriz/amostra. A matriz absorve a energia do laser e é volatilizada, arrastando para a fase de vapor as moléculas da amostra, que são ionizadas pela matriz e então aceleradas em direção ao analisador por tempo de voo.

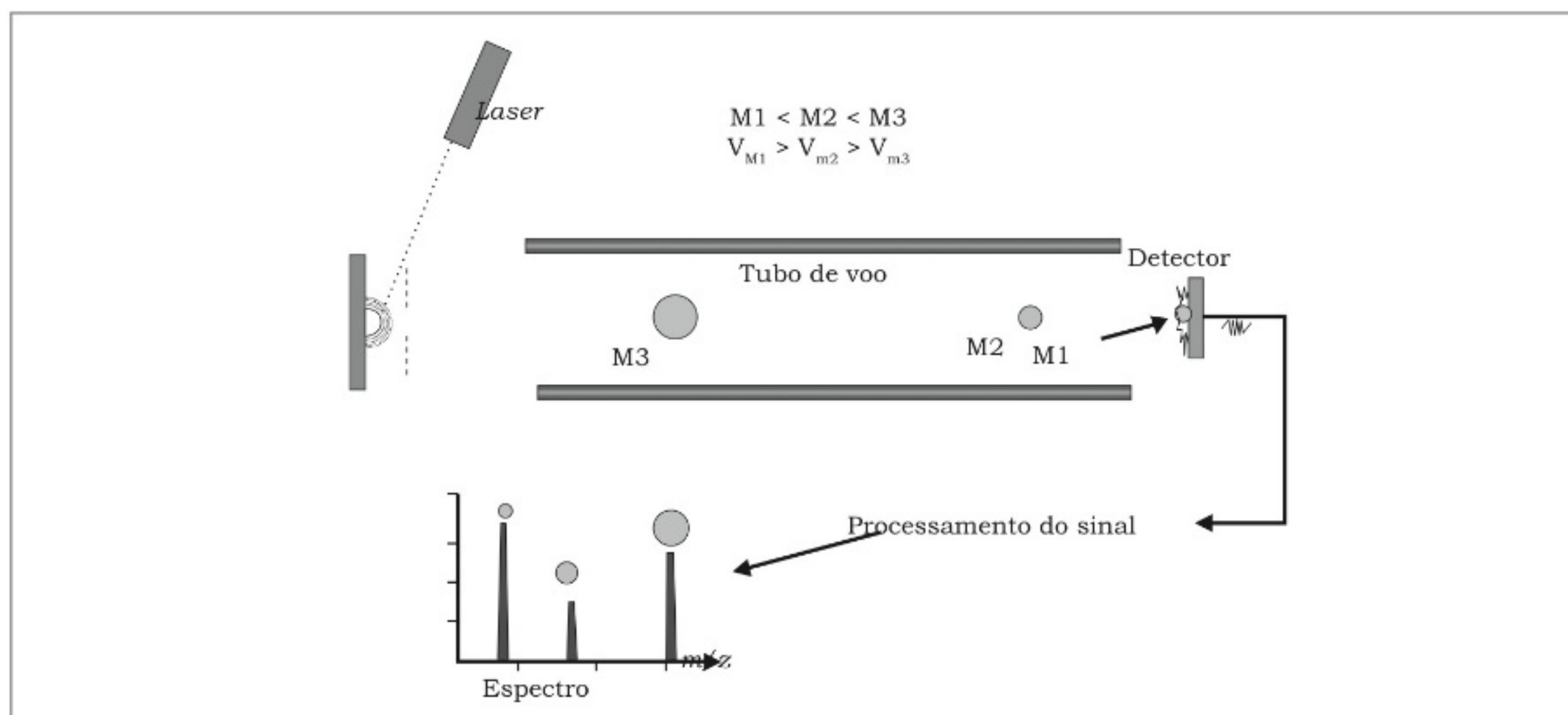


Figura 27.5 – Processo de separação de íons em um analisador por tempo de voo (ToF) linear. Íons acelerados na fonte de íons com a mesma energia apresentam velocidades proporcionais a sua relação entre massa e carga, (m/z), sendo que íons com menor valor de m/z são mais rápidos que aqueles com m/z maior. Dessa forma, a partir do tempo necessário para íons de um dado valor de m/z pode-se determinar a massa molar da substância sendo analisada.

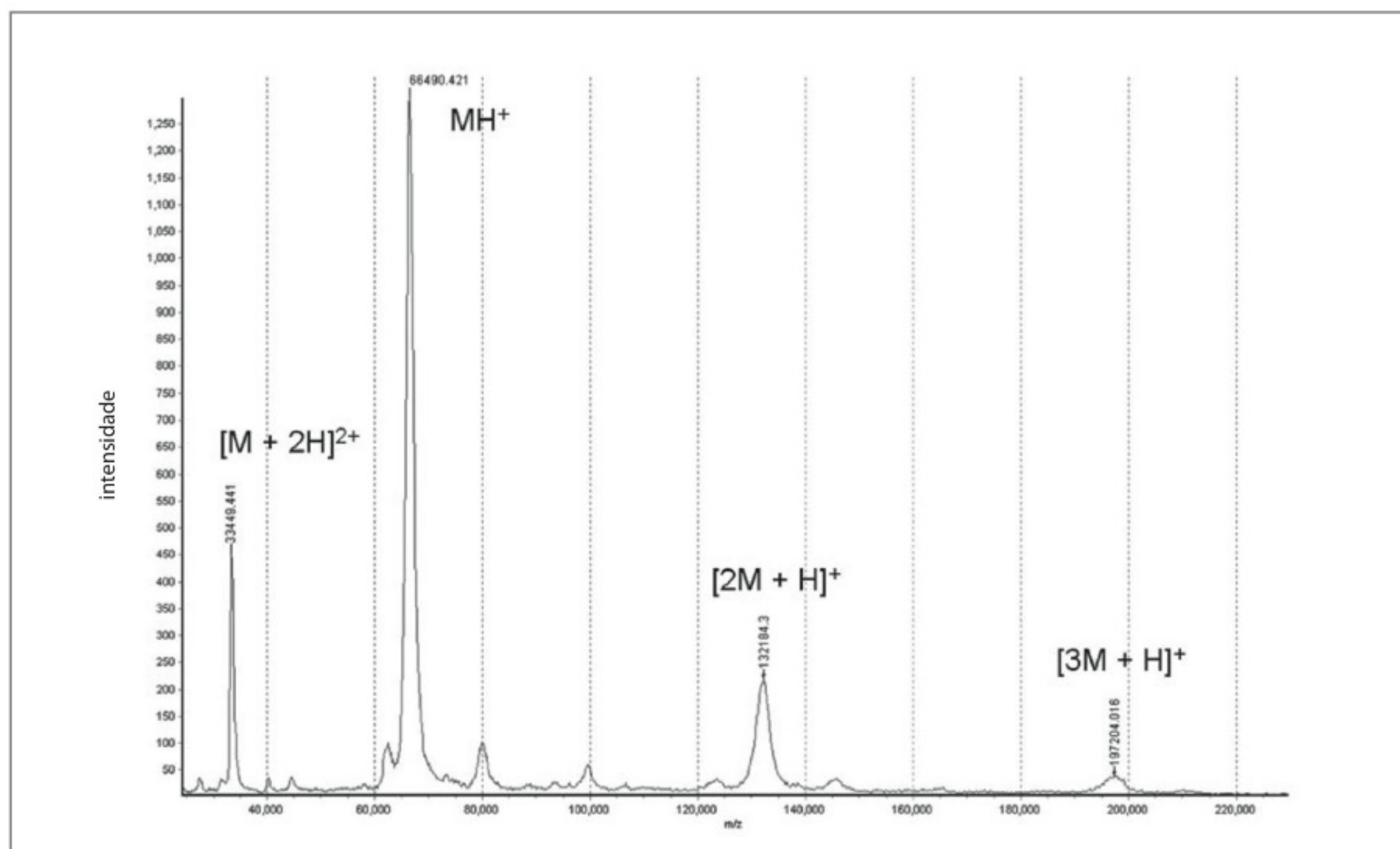


Figura 27.6 – Espectro de MALDI-ToF da proteína BSA. Nesse espectro podem ser observados os sinais do íon com uma unidade de carga, representando a massa molar da proteína protonada (MH^+), e também sinais do íon com duas cargas, $[M + 2H]^{2+}$, além do dímero $[2M + H]^+$ e trímero $[3M + H]^+$ da proteína.

Em espectrometria de massas, **resolução** é a capacidade de um sistema para separar diferenças mínimas de massas. A resolução é expressa pela fórmula:

$$R = m/\Delta m$$

Onde Δm é a diferença de massa entre dois picos adjacentes que são pouco separados e m é a massa nominal do primeiro pico. Dois picos são considerados separados se a altura do vale entre eles não ultrapassa uma dada porcentagem de suas alturas (normalmente 10%). Assim, um espectrômetro com resolução de 10.000 deve resolver picos ocorrendo a valores de m/z de 1.000,0 e 1.000,1 (Skoog e Leary, 1992).

Outra forma utilizada para o cálculo da resolução de um analisador é o de largura do pico a meia altura (FWHM, *Full Width at Half Maximum*). Nesta forma, o cálculo é mais simples, e utiliza a relação entre o valor de m/z do pico com a largura do pico (em m/z) a 50% de sua altura máxima.

Em análises por MALDI ToF linear, a resolução não é muito boa, e a principal razão disso é que, quando os íons são acelerados na fonte, eles podem estar em posições diferentes na fonte e, com isso, chegam ao detector em um intervalo de tempo maior do que o necessário para a separação de isótopos, pois vai haver um intervalo de tempo entre os primeiros e os últimos íons de mesmo valor de m/z alcançarem o detector. Para resolver esse problema, foi desenvolvido um dispositivo conhecido como *reflectron*, que tem a capacidade de corrigir diferenças de posição e velocidade de íons e com isso aumentar sensivelmente a resolução em uma análise de peptídeos por MALDI. Na figura 27.7 tem-se o esquema da separação de íons por MALDI ToF *reflectron*.

O reflectron consiste em um arranjo de anéis metálicos, aos quais é aplicado um potencial elétrico com a mesma carga dos íons que estão sendo analisados. Esse potencial vai aumentando em cada anel, criando assim um campo elétrico crescente. Os íons acelerados na fonte, ao entrarem neste campo elétrico, são desacelerados e reacelerados na direção oposta, em direção a um detector que fica na saída do dispositivo. Íons com a mesma m/z em diferentes posições vão apresentar diferentes trajetórias que vão corrigir essas diferenças de posição, e com isso aumentar sensivelmente a resolução da análise. As análises por MALDI ToF *reflectron*, entretanto, são limitadas a íons com m/z até cerca de 5.000, de forma que proteínas com alta massa molar devem ser analisadas no modo linear. A figura 27.8 mostra a comparação de sinais típicos para um peptídeo obtidos no modo li-

near e *reflectron*, mostrando como a diferença de resolução influencia a análise.

A alta resolução obtida no modo *reflectron* tem grande importância na análise de peptídeos de digestão de proteínas:

- A diferenciação de peptídeos com pequenas diferenças de massa (< 0,5 Da) pode ser feita eficientemente, o que não seria possível em uma análise linear. Para isso, é importante também a exatidão da medida, que pode ser melhorada com o uso de padrões internos de massa.
- Com a separação monoisotópica dos picos, pode-se garantir que os sinais que serão considerados na busca em bases de dados são realmente gerados por peptídeos e não devido a ruído de linha de base, o que é importante principalmente quando são feitas análises com baixa concentração de amostra ou no modo automático de processamento de espectros.
- Pode-se determinar o estado de carga de um íon, pois, como o sinal mede a relação entre a massa e a carga, para um íon com dupla carga, o valor da massa será dividido por dois, e esse íon apresentará isótopos diferenciados por 0,5 Da de massa.

Peptide Mass Fingerprint

Peptide mass fingerprint é a forma mais simples e rápida de se identificar proteínas utilizando espectrometria de massas e bioinformática. A técnica baseia-se na análise dos peptídeos gerados por digestão enzimática de uma proteína, que vai então gerar uma lista de valores de m/z . A análise utilizando MALDI gera resultados mais simples de serem analisados devido à formação de íons com apenas uma unidade de carga, de forma que pode-se considerar que cada valor de m/z pode ser relacionado com um peptídeo. O conjunto de valores de massas dos peptídeos é chamado de impressão digital (*fingerprint*) de uma proteína, e é o parâmetro utilizado na identificação.

Quando a digestão enzimática de uma proteína é feita utilizando-se uma enzima com sítios de clivagem específicos, como por exemplo a tripsina (que rompe proteínas no lado C-terminal dos aminoácidos lisina e arginina), o mesmo grupo de peptídeos será formado, e o espectro desta proteína digerida com tripsina apresentará sempre os mesmos sinais de m/z . Esse conjunto de valores é comparado com bases de dados de proteínas, nos quais estão depositadas sequências completas de proteínas. Com a informação do tipo de enzima utiliza-

da (e, portanto, os sítios de clivagem), é feita uma “digestão” virtual (*in silico*) gerando a informação das massas moleculares dos peptídeos formados ao se romper a proteína nos sítios específicos. Os valores experimentais são então comparados com os valores gerados na base de dados, e o resultado é então apresentado como uma lista das proteínas da base de dados com maior probabilidade de serem idênticas à proteína sendo analisada, baseada no número de valores de m/z presentes nos dados experimental e de base de dados.

Esta busca pode ser feita não apenas em bancos de dados de proteínas, mas também em bases de dados

de sequências de DNA, que são transformadas a sequências de aminoácidos. Essas proteínas hipotéticas são da mesma forma “digeridas” gerando listas de massas de peptídeos a serem utilizadas na busca. Um esquema desse processo é apresentado na figura 27.9.

Em análises por PMF, não são os espectros de massas, mas sim uma lista de massas gerada a partir do espectro o parâmetro utilizado na comparação. Isso faz com que a identificação seja bastante rápida, e uma busca em uma base de dados completa, com mais de 200.000 proteínas, possa ser realizada em poucos segundos por meio da Internet.

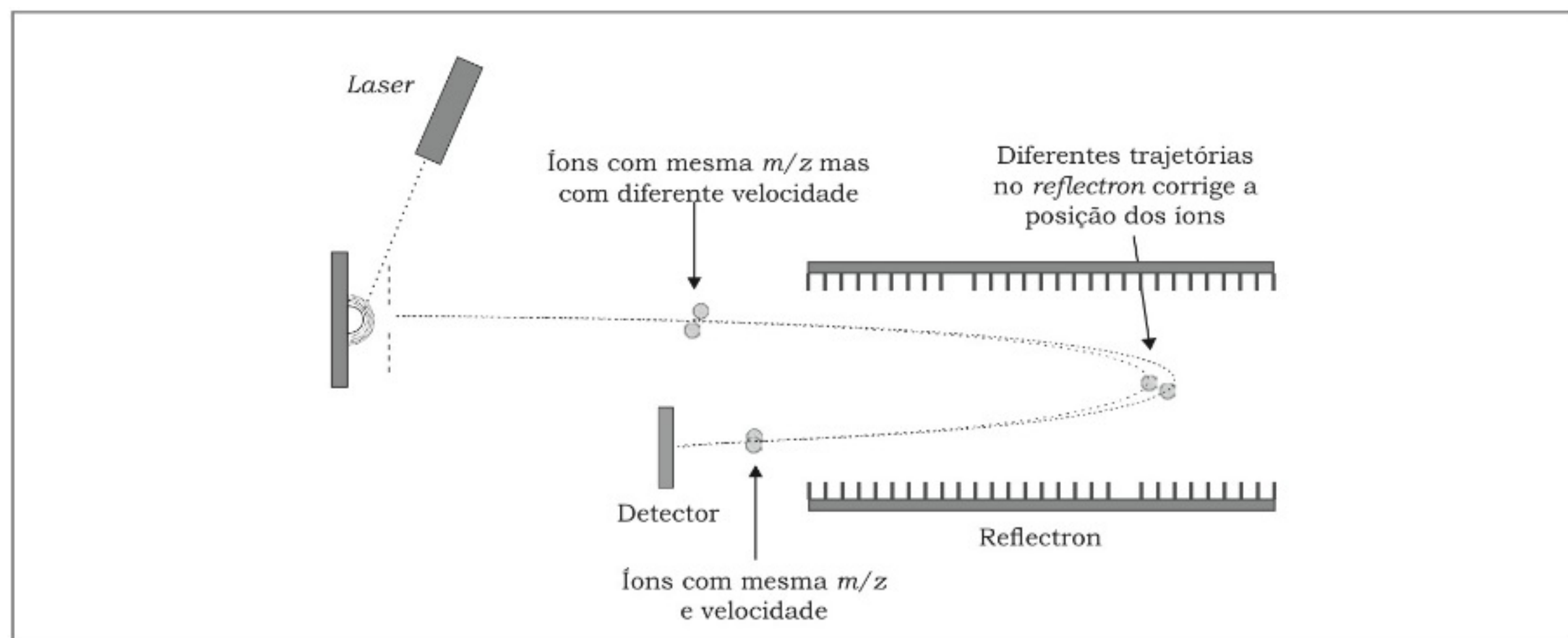


Figura 27.7 – Processo de separação de íons em um analisador por tempo de voo (ToF) reflectron. Pequenas diferenças na velocidade de íons podem ser corrigidas no reflectron, aumentando a resolução e exatidão da análise. O reflectron cria um campo elétrico crescente com a mesma carga dos íons, que ao entrarem neste dispositivo são desacelerados e reacelerados em direção ao detector. Diferentes trajetórias de íons com diferentes velocidades fazem com que tenham a velocidade corrigida, e íons com massa idêntica chegam ao detector exatamente no mesmo momento.

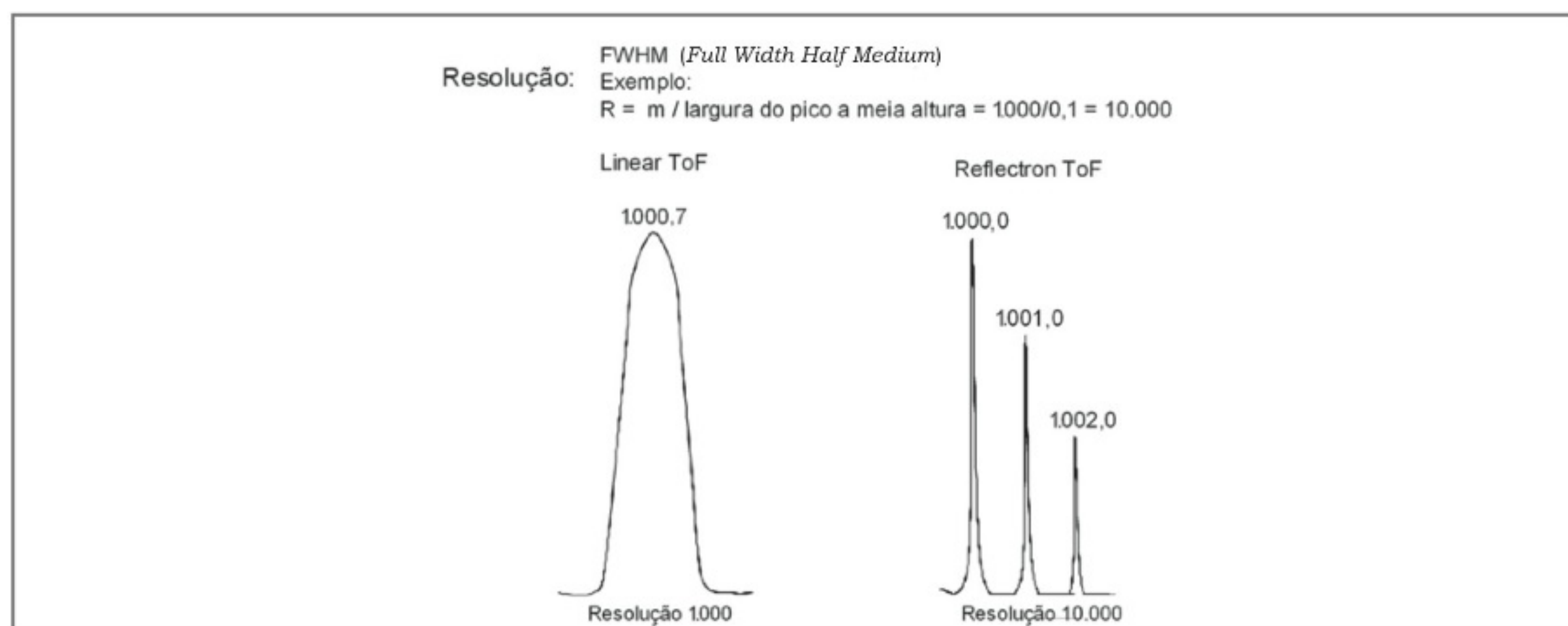


Figura 27.8 – Picos de espectros de massas com diferentes valores de resolução. A resolução pode ser definida como a capacidade de um analisador de massas de separar diferenças mínimas de valores de m/z . Análises no modo reflectron apresentam alta resolução, necessária na análise de peptídeos de digestão enzimática.

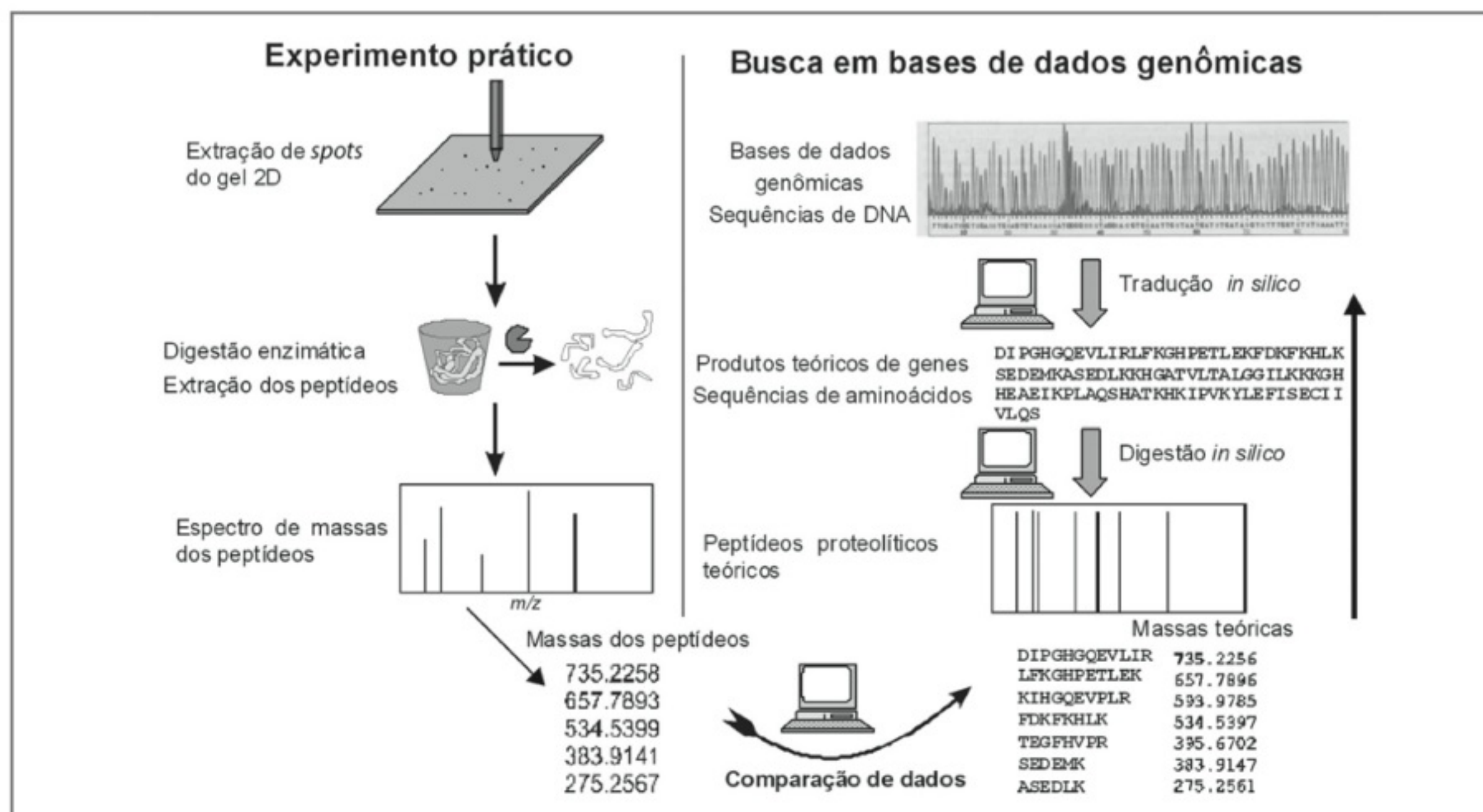


Figura 27.9 – Esquema de identificação de proteínas por *peptide mass fingerprint* (PMF). Amostras provenientes de géis 2D são submetidas à digestão enzimática, e a determinação do conjunto de massas dos peptídeos gerados na digestão é a impressão digital da proteína, que é comparada com bases de dados de proteínas para gerar a identificação de proteínas de forma rápida e eficiente.

Nestas buscas, outros tipos de filtro podem ser utilizados, como a taxonomia do organismo sendo estudado, faixas de pI e massa molar das proteínas (informação que pode ser obtida por eletroforese bidimensional). Com isso, pode-se restringir a busca de proteínas com estas características, tornando a busca mais específica e a identificação mais segura.

Entretanto, essa identificação depende da presença da proteína nas bases de dados. Para proteínas não descritas em bases de dados, de organismos que não tenham seu genoma sequenciado, outras técnicas de espectrometria de massas são utilizadas para o sequenciamento de peptídeos.

Sequenciamento de Peptídeos

O sequenciamento de uma proteína intacta utilizando a espectrometria de massas ainda não é possível. Entretanto, a determinação da sequência primária de peptídeos pode ser eficientemente realizada pela técnica, gerando dados que muitas vezes são suficientes para a identificação de proteínas por comparação com bases de dados.

O princípio básico do sequenciamento de peptídeos por espectrometria de massas consiste na diferenciação de aminoácidos a partir da massa molar de íons e da

sua fragmentação sequencial. A figura 27.10 apresenta as estruturas, a composição química e a massa molar dos 20 aminoácidos essenciais.

Para o sequenciamento preciso de aminoácidos é necessário que o espectrômetro de massas apresente alta resolução, que permita a separação de pequenas diferenças de massas, como a dos aminoácidos como glutamina e lisina, entre os quais existe uma diferença de massas de 0,3 Da. Alta exatidão é também necessária para a determinação da composição química de peptídeos e fragmentos.

Diferentes técnicas possibilitam a fragmentação dos íons moleculares de peptídeos gerando uma sequência de fragmentos de íons que permitem a determinação da sequência do peptídeo. A figura 27.11 mostra os tipos de íons frequentemente observados na fragmentação de peptídeos por métodos de fragmentação de íons como MS/MS e PSD, e a denominação utilizada para estes. A numeração destes íons é feita a partir do íon de menor massa, assim as séries C-terminais são numeradas a partir do lado C-terminal, e os íons N-terminais, a partir do lado N-terminal.

Para a determinação de uma sequência de aminoácidos de um peptídeo, deve-se deduzir a qual série de picos

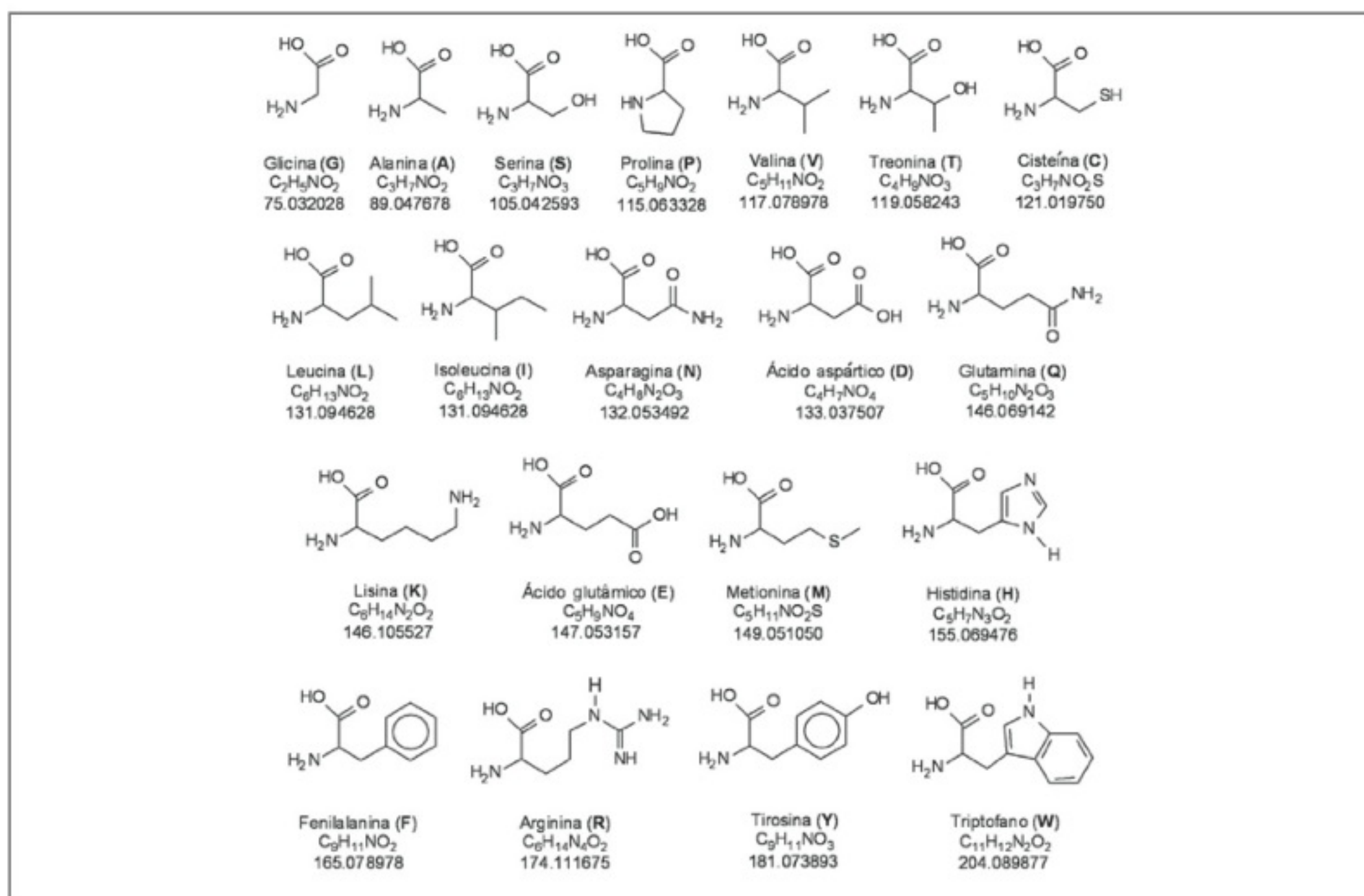


Figura 27.10 – Estruturas químicas, composição química e massa molar dos 20 aminoácidos essenciais.

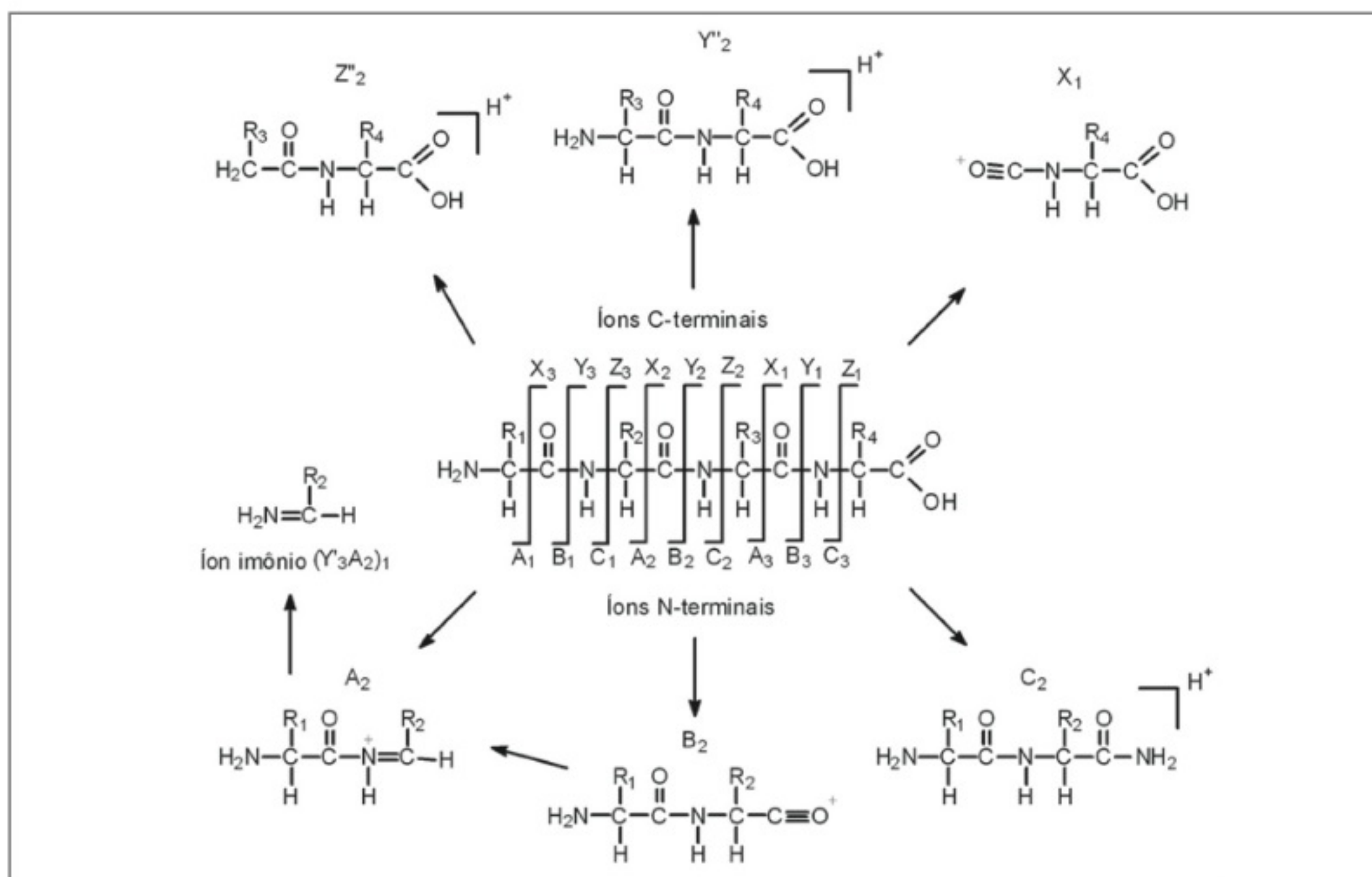


Figura 27.11 – Denominação e estruturas de fragmentos de íons formados a partir de peptídeos em análises por espectrometria de massas. A informação sobre a estrutura primária de um peptídeo pode ser obtida a partir do conjunto de íons de fragmento formados na decomposição de peptídeos produzidos em experimentos de MS/MS ou PSD. Os íons formados do lado C-terminal são denominados X, Y e Z, enquanto os íons do lado N-terminal são denominados A, B e C. Além destes, íons imônio são formados em decomposições destes íons.

corresponde cada sinal no espectro, o que muitas vezes pode ser uma tarefa bastante complexa. Geralmente espectros de MS/MS apresentam uma grande quantidade de sinais que podem variar bastante em relação à intensidade, sendo que alguns dos íons de uma série podem não estar presentes no espectro. Comumente, as séries b e y geram picos mais intensos, e são as primeiras séries a serem investigadas. Após a localização dos picos de uma série, a sequência pode ser determinada calculando-se a diferença de massas entre os picos consecutivos de cada série e relacionando essas diferenças de massas com as de resíduos de aminoácidos ($MM_{\text{aminoácido}} - 18$), e não com a massa do aminoácido isoladamente, pois, quando são ligados um ao outro por ligações peptídicas, os aminoácidos perdem uma molécula de H_2O , e as diferenças de massas dos fragmentos são na verdade as massas destes resíduos. A tabela 27.1 apresenta as massas monoisotópicas e médias dos fragmentos dos aminoácidos comuns e também as modificações mais comuns a cada um, com a respectiva alteração de massa molar.

O sequenciamento de um peptídeo é feito a partir das diferenças de massas entre fragmentos da mesma série de íons, considerando os valores de m/z dos íons formados na fragmentação. Dessa forma, é necessária a identificação destas séries no espectro de massas para que a sequência de aminoácidos possa ser determinada. A identificação destas séries de íons nem sempre é uma tarefa simples, pois muitas vezes a mistura de íons de diferentes séries tornam o espectro bastante complexo. A digestão enzimática utilizando tripsina é utilizada na grande maioria das análises por MS/MS, pois os resíduos básicos arginina e lisina fazem com que a carga fique localizada preferencialmente nestes resíduos do lado C-terminal, gerando espectros com séries y dominantes e íons b pouco intensos, o que facilita a identificação (Staudenmann e James, 2001). A interpretação dos resultados pode ser feita com a utilização de *softwares* de interpretação, que vai depender muito da qualidade dos espectros de MS/MS, sendo que em muitos casos é necessária a interpretação manual dos

Tabela 27.1 – Massas molares monoisotópicas e médias e modificações mais comuns para os 20 aminoácidos essenciais.

	Massa monoisotópica	Massa média	Modificações mais comuns (e adi- ções de massa molecular nominal)
Glicina (G)	57.02146	57.0519	
Alanina (A)	71.03711	71.0788	
Serina (S)	87.03203	87.0782	Fosforilação (80); O-glicosilação
Prolina (P)	97.05276	97.1167	
Valina (V)	99.06841	99.1326	
Treonina (T)	101.04768	101.1051	Fosforilação (80); O-glicosilação
Cisteína (C)	103.00919	103.1388	Carbamidometil (57); S-propionamida (71); S-piridiletil (105)
Leucina (L)	113.08406	113.1594	
Isoleucina (I)	113.08406	113.1594	
Asparagina (N)	114.04293	114.1038	N-glicosilação (162 para glicose)
Ácido aspártico (D)	115.02694	115.0886	Esterificação (14 para ester metílico)
Glutamina (Q)	128.05858	128.1307	
Lisina (K)	128.09496	128.1741	Acetilação (42), homoarginina (42)
Ácido glutâmico (E)	129.04259	129.1155	Esterificação (14 para éster metílico)
Metionina (M)	131.04049	131.1926	Oxidação (16)
Histidina (H)	137.05891	137.1411	
Fenilalanina (F)	147.06841	147.1766	
Arginina (R)	156.10111	156.1875	
Tirosina (Y)	163.06333	163.1760	Fosforilação (80)
Triptofano (W)	186.07931	186.2132	Oxidação (16)

resultados. Neste capítulo não será detalhada a interpretação de espectros de MS/MS de peptídeos, mas na literatura podem-se encontrar vários textos descrevendo métodos para interpretação desses espectros (Staudenmann e James, 2001; Aebersold e Goodlett, 2001) (Fig. 27.12).

Considerações Finais

O desenvolvimento verificado nos últimos anos no campo da análise proteômica é bastante similar ao observado em genômica na década passada. O crescimento no número de proteínas e sequências de DNA presentes em bases de dados tem tornado possível a identificação de proteínas de forma rápida e segura. Uma corrida em busca de novas tecnologias por empresas e por grupos acadêmicos faz com que as análises se tornem cada vez mais rápidas, sensíveis e eficientes e confiáveis. Uma grande variedade de sistemas está atualmente disponível, apresentando diferentes opções para a separação, detecção, identificação e quantificação de proteínas em

misturas complexas. As técnicas baseadas em eletroforese bidimensional e MALDI são atualmente as mais simples e estabelecidas, e podem ser feitas em alta escala com a utilização de sistemas robotizados. As tecnologias envolvendo cromatografia líquida multidimensional acoplada a espectrometria de massas (LC-ESI-MS/MS) e *arrays* de proteínas vêm-se desenvolvendo rapidamente. Essas técnicas, entretanto, apresentam vantagens e limitações, sendo que nenhuma delas é capaz de analisar todas as proteínas de um organismo, sendo complementares umas às outras.

Laboratórios em todo mundo vêm utilizando essas técnicas no estudo de doenças e tratamentos, de vários organismos, incluindo projetos envolvendo o proteoma humano, de vírus, bactérias e plantas. Nos próximos anos espera-se que os resultados desses estudos tragam melhorias diretas à sociedade, como técnicas de diagnóstico e novas drogas e tratamentos no combate a várias doenças, como o câncer, e também no controle de pragas que atacam a agricultura.

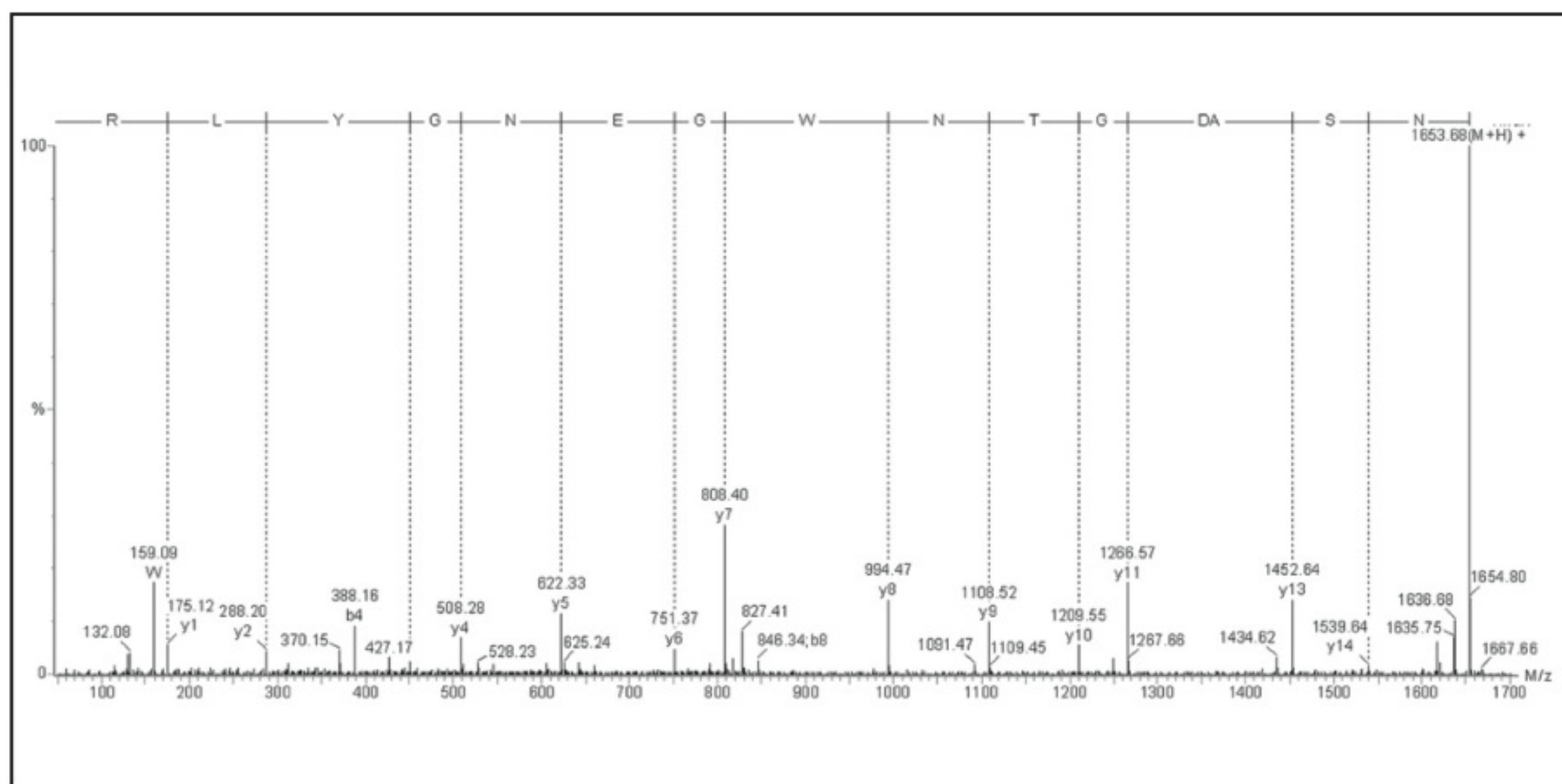


Figura 27.12 – Espectro de ms/ms de um peptídeo com carga +2, de m/z 827 obtido em um sistema Q-70f. A sequência do peptídeo se refere à série y do peptídeo com massa molar 1653 Da para a espécie protonada.

Referências

- Aebersold, R.; Goodlett, D.R. Mass spectrometry in proteomics. *Chem. Rev.*, 101:269-295, 2001.
- Beavis, R.C.; Chaudhary, T.; Chait, B.T. α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Org. Mass Spectrom.*, 27:156, 1992.
- Fenn, J.B.; Mann, M.; Meng, C.K.; Wong, S.F.; Whitehouse, C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246:64-71, 1989.
- Galvani, M.; Hamdan, M.; Righetti, P.G. Two-dimensional gel electrophoresis/ matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of commercial bovine milk. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 15:258-264, 2001.
- Karas, M.; Hillenkamp, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 Daltons. *Anal. Chem.*, 60:2299-2301, 1988.
- Scheer, J.M.; Ryan, C.A. A method for the quantitative recovery of proteins from polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 298:130-132, 2001.
- Staudenmann, W.; James, P. Interpreting peptide tandem mass-spectrometry fragmentation spectra. In: James, P. (Ed.). *Proteome Research: Mass Spectrometry*. Berlin: Springer, 2001. p. 143-166.
- Wasinger, V.C.; Cordwell, S.J.; Cserpa-Poljak, A.; Yan, J.X.; Gooley, A.A.; Wilkins, M.R.; Duncan, M.W.; Harris, R.; Williams, K.L.; Humphrey-Smith, I. Progress with gene-product mapping of the mollicutes. *Electrophoresis*, 16:1090-1094, 1995.
- Westermeier, R.; Naven, T. *Proteomics in Practice*. Weinheim: Wiley-VCH; 2002.
- Wolters, D.A.; Washburn, M.P.; Yates, J.R. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal. Chem.*, 73:5683-5690, 2001.

28. HPLC – para Isolamento e Identificação de Compostos

Ivo Lebrun

Introdução

A cromatografia líquida de alto desempenho (CLAD), mais conhecida como HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography* é uma técnica para separação, purificação e, em alguns casos, de identificação de compostos com mais diversas características. Tem aplicação crescente na indústria (farmacêutica, cosméticos, alimentos, petroquímica etc.) em laboratórios de análises clínicas e toxicológicas, entre outros, além, é claro, da pesquisa científica. As principais características que têm tornado esta técnica uma ferramenta de uso crescente em todos estes campos é a rapidez de sua execução aliada a uma excelente sensibilidade e reprodutibilidade. Aliada a estas características, é, na maioria das vezes, uma técnica não destrutiva, isto é, o material separado mantém-se intacto, o que tem muitas vezes justificado a troca de cromatógrafos gasosos pelo cromatógrafo líquido, uma vez que a amostra submetida à cromatografia líquida pode ser utilizada em outros ensaios, o que não ocorre com o primeiro.

O custo do equipamento tem diminuído sensivelmente e depende basicamente da sua configuração e acessórios que serão acoplados. Um sistema simples de uma bomba, um espectrofotômetro de comprimento de onda fixo, um registrador gráfico tem custo aproximado de U\$ 7-8.000, enquanto um sistema de gradiente com injetor e coletor automático de amostras, vários detectores, degaseificador de solventes e aquisição de dados via computador têm custo de até U\$ 70.000 e se adicionarmos a este sistema um detector de massas este custo chega a quadruplicar!

Entretanto, é preciso ter a noção de que um sistema deste tipo deve adequar-se a exigências e necessidades do usuário e as tarefas que deverão ser executadas pelo equipamento. Existe um sem-número de revisões, além de livros, que descrevem o equipamento e a técnica em questão. Este capítulo não tem a pretensão de esgotar o

assunto, mas sim de possibilitar ao leitor uma abordagem inicial da técnica. Devem-se fornecer os aspectos fundamentais do equipamento bem como dos seus componentes, além de abordar algumas aplicações, incluindo-se aí algumas técnicas operacionais. Outro aspecto importante é que em muitos casos, como na indústria farmacêutica ou em laboratórios que efetuam análises, os equipamentos utilizados passam por um processo de validação de seus componentes, o que garante a credibilidade, a exatidão e a reprodutibilidade dos resultados obtidos. Estes aspectos possuem legislação específica e não serão abordados neste capítulo.

Histórico

A cromatografia (do latim *cromathos* – cor e *graphos* escrita, registro) é uma técnica desenvolvida há muitos séculos, em que, no princípio, extratos de plantas eram separados pela adsorção de um líquido (solvente aquoso ou orgânico) em uma base sólida (papel ou sílica aplicada em uma placa de vidro). Normalmente, esta técnica resultava na separação de “manchas” com diferentes colorações, daí o nome. Posteriormente, verificou-se que o adsorvente (também denominado de fase estacionária) poderia ser particulado de diversas formas e colocado em colunas de vidro de diversos tamanhos (colunas) desenvolvendo-se, a partir daí, as resinas cromatográficas baseadas em celulose, polisacarídeos, poliacrilatos etc. como as resinas de Sephadex, Biogel etc. Estas resinas acondicionadas em colunas possibilitavam a recuperação do material com mais facilidade, além da separação de quantidades muito mais significativas de material (incluindo-se a escala industrial de purificação). Isto permitiu também a adoção de sistemas de registro da cromatografia e coleta das frações que eram eluídas através de coletores automatizados, facilitando em muito o procedimento. Mais ainda, o registro deixou de ser efetuado pela observação direta de manchas

coloridas ou ainda pela aplicação de corantes à sílica ou papel, para o monitoramento através de espectrofotômetros em diversos comprimentos de onda. Este fato ampliou ainda mais a sensibilidade da metodologia, além de permitir a identificação dos componentes da mistura sem interferir na sua estrutura. O solvente (ou fase móvel) utilizado para permear o gel e carrear, de acordo com a resina empregada ou os diferentes componentes da mistura, pode ser um solvente aquoso ou orgânico e em muitos casos é um tampão com pH fisiológico capaz de reter a atividade, principalmente de compostos de origem biológica, como, por exemplo, enzimas, peptídeos etc. A cromatografia líquida de alto desempenho (CLAD) apareceu no final dos anos 60 e início dos anos 70 como um desenvolvimento da cromatografia convencional ou de baixa pressão. Este avanço só foi possível pelo desenvolvimento de sistemas de bombeamento em alta pressão de pequenos volumes (ao redor de 1 mL por minuto), mas, principalmente, de resinas cromatográficas derivadas de sílica com propriedades bastante particulares e que eram capazes de resistir a altas pressões (ao redor de 2.500 psi). As

resinas convencionais, mesmo as mais rígidas, não resistiam a pressões superiores a 400 psi e a sílica convencional utilizada em técnicas de camada delgada ou cromatografia gasosa não apresentava as características químicas necessárias para separar compostos químicos como proteínas e peptídeos, embora fossem bastante satisfatórias para compostos orgânicos e inorgânicos mais simples do que os anteriores. Esta técnica também tem substituído em muitos casos a cromatografia convencional, principalmente em função da rapidez que a técnica pode ser executada.

O que é o Equipamento de HPLC

A figura 28.1 ilustra os principais componentes que fazem parte integrante de um equipamento de HPLC, cada um dos módulos será descrito a seguir.

Bomba

O equipamento de HPLC é um sistema de cromatografia dotado, em geral, por uma (sistema isocrático)

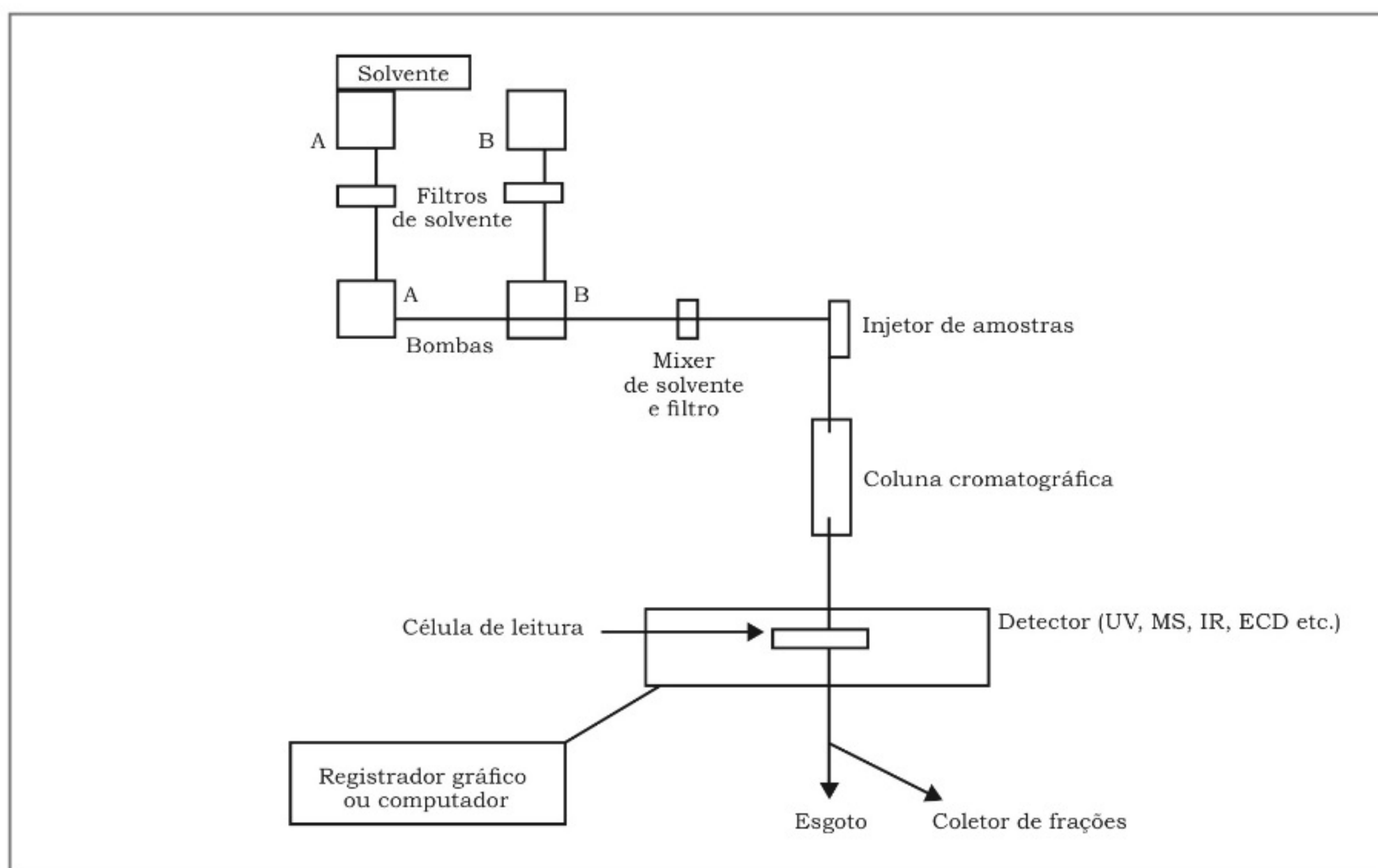


Figura 28.1 – Principais componentes do equipamento HPLC.

ou duas bombas (sistema gradiente binário), podendo ter até quatro bombas ou capacidade de bombear até quatro solventes diferentes (sistema quaternário). Estas bombas são confeccionadas em material resistente a abrasão (aço inox) e o cilindro que bombeia o solvente normalmente é de safira sintética. Os volumes a serem bombeados variam desde microlitros por minuto até 100 mL ou mais (em sistemas preparativos). Em função de o volume ser, na maioria das vezes, reduzido e da precisão como deve ocorrer este bombeamento, além da alta pressão a que é submetido o solvente, as bombas são controladas por microprocessadores. Outra característica desta bomba é que ela trabalha com dois pistões em movimentos alternados ou ainda é dotada de sofisticados sistemas de amortecimento de pulso para evitar que o pulso de solvente provocado pela bomba possa acarretar o registro de um pico inexistente.

O Injetor

O injetor de amostras pode ser de dois tipos, o com fluxo parado no qual o bombeamento deve ser interrompido para a injeção da amostra, e, o mais comum e moderno, o com fluxo contínuo, também conhecido pelo

nome comercial de Rheodyne. Este injetor permite que se faça a injeção da amostra dentro de um *loop* sem que seja necessário interromper o fluxo. A vantagem deste injetor é que o sistema se mantém em equilíbrio, o que, em determinadas ocasiões, é fundamental para que uma análise seja reprodutiva. Os volumes que podem ser injetados variam desde microlitros até vários mililitros.

A figura 28.2 ilustra a construção de um injetor Rheodyne e suas posições de carga da amostra e injeção para a coluna.

Coluna

A coluna cromatográfica para HPLC normalmente consiste em um tubo de inox de alta resistência a pressão contendo uma resina também resistente a altas pressões compactada através de prensa. Dessa forma, ao contrário do que ocorre em sistemas convencionais de cromatografia, é inviável se executar a tarefa de empacotamento da resina dentro da coluna por processo manual. Falaremos com mais detalhe sobre as diferentes características que as resinas podem apresentar. Analogamente do que ocorre com a cromatografia conven-

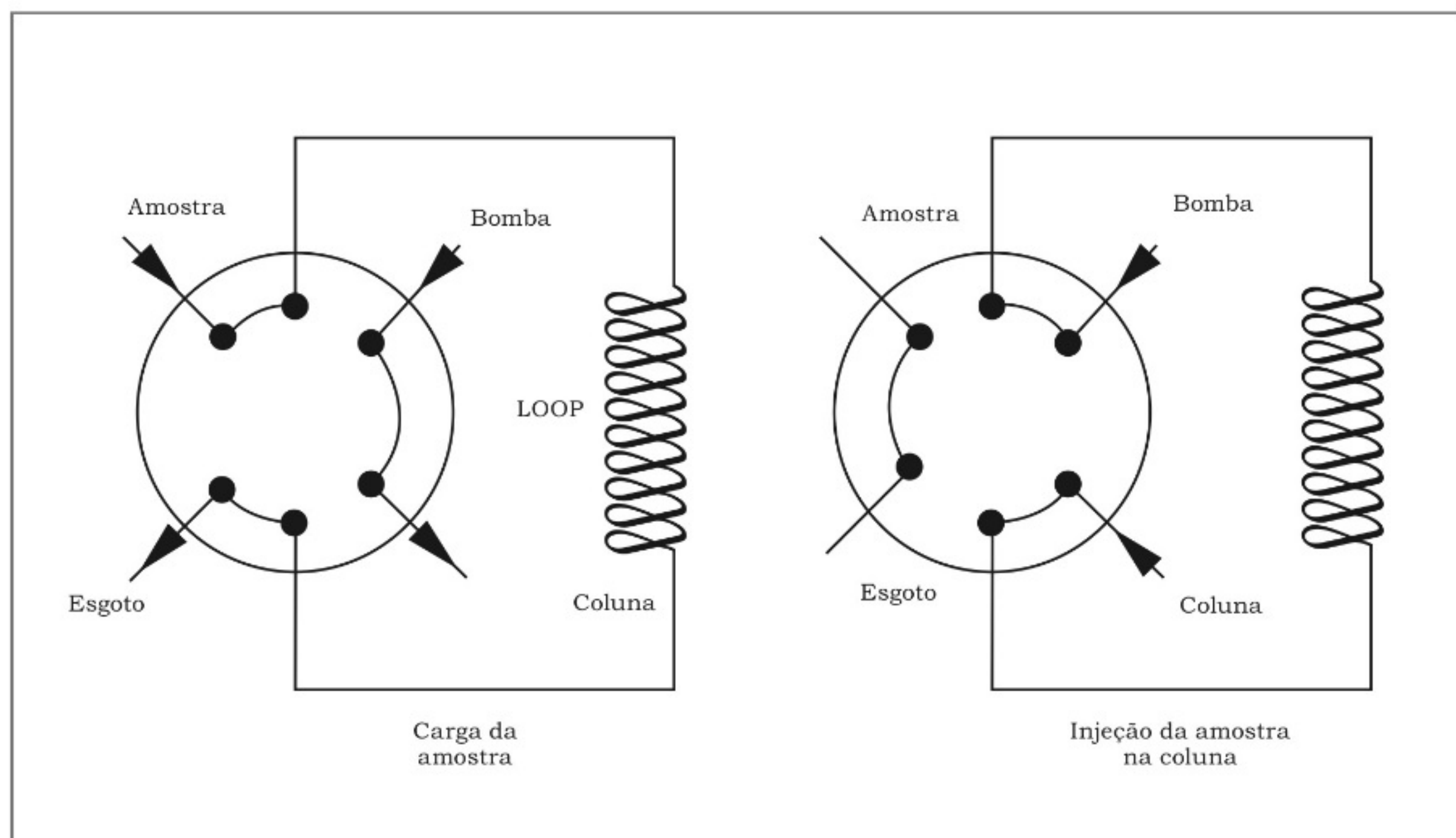


Figura 28.2 – Construção de um injetor Rheodyne e suas posições de carga.

cional, o comprimento e a largura da coluna variam de acordo com a maior ou menor quantidade de material que será separada, podendo ser divididas em:

Colunas analítica: com diâmetro de 2-6 mm e comprimento que varia de 10 a 30 cm para as resinas porosas e de 50 a 100 cm para as resinas peliculares.

Colunas preparativa: geralmente com diâmetro acima de 6 mm e comprimentos de 25 a 100 cm.

Não estão incluídas as colunas de uso industrial de tamanho bem maior.

Normalmente, estas colunas são mantidas à temperatura ambiente, podendo haver, em alguns casos, a necessidade de termostatar a coluna (como no caso da análise de aminoácidos, separação de polímeros etc.)

Existem ainda as pré-colunas, normalmente de 4,6 mm por 1 a 5 cm, cujo objetivo é o de proteger a coluna principal de possíveis contaminantes presentes na amostra a ser purificada; nesta coluna, por suas dimensões reduzidas e por não ter função de separação, é possível trocar a resina quando já está muito suja ou quando a pré-coluna apresenta aumento excessivo na pressão de trabalho.

Resinas

As resinas que irão constituir o “recheio” das colunas podem ter as mais diversas características, contribuindo, com isto, para a versatilidade que o equipamento apresenta tanto nos processos de purificação como nas rotinas analíticas. Entretanto, todas elas apresentam uma característica em comum à resistência a pressões elevadas provocadas pelo bombeamento do solvente em alta pressão. Esta capacidade de resistir a pressões elevadas pode variar desde 20 bar até 300 bar, colunas convencionais, mesmo as mais rígidas resistem a apenas 4-5 bar. Mais especificamente sobre as resinas utilizadas para purificação e análise de proteínas, podemos citar as de fase reversa, cuja matriz é baseada em sílica 100 ou 60 e que podem ter acoplados a esta matriz diferentes “braços” de carbono como C4 (butil), C8 (octil) e C18 (octadecil), sendo as duas primeiras utilizadas mais para polipeptídeos e macromoléculas e a última para peptídeos e compostos de baixo peso molecular. Além destas, podemos utilizar colunas com resinas de menor pressão de trabalho, principalmente para a separação de macromoléculas entre estas podemos citar as de troca iônica (DEAE e CM), as de permeação em gel (TSK-SW 2000, 3000, 4000) e outras de diverso fabricantes. Normalmente, a base destas

resinas é polimérica (poliestireno-divinilbenzeno) e os métodos de separação são similares aos executados em colunas convencionais e de FPLC (*fast protein liquid chromatography*), com a diferença de que a resolução é mais satisfatória e o inconveniente de que as quantidades a serem injetadas normalmente são menores. Existem, além destas, colunas de separação quiral, capazes de separar isômeros d e l; outras colunas com grupamentos fenil, ciano, amino etc. são utilizadas para aplicações específicas. Não nos deteremos neste capítulo nas bases matemáticas que possibilitam a avaliação dos parâmetros de separação, falaremos apenas de algumas definições para que o leitor tenha em mente que estes parâmetros são a base para a obtenção dos resultados observados na prática. Entre os principais termos e conceitos temos:

Fase estacionária – é a resina que preenche a coluna, podendo ter características as mais diversas, conforme vimos anteriormente.

Fase móvel – é o solvente ou mistura de solventes (no caso de gradiente de solvente) e responsável pelas mudanças dinâmicas durante o processo, modificando a interação entre o analito (substância que se quer purificar ou analisar) e a fase estacionária.

Volume morto – é o volume interno da coluna preenchido apenas pelo solvente, isto é, retirando-se o volume correspondente ocupado pela resina cromatográfica. Este volume depende do tipo de resina e poro interno que a resina pode ter. De modo geral o volume morto de um sistema de HPLC é representado pela coluna e pelo sistema de condução e corresponde ao volume coletado a partir da injeção da amostra até o pico de injeção (que é o primeiro pico observado após a injeção do material), que corresponde ao material não retido na coluna.

Tempo de retenção ou fator de capacidade (k') – o volume morto para efeitos de cálculo pode incluir o volume existente nas conexões desde o injetor até a saída do detector.

Seletividade ou fator de separação (α) – é a relação existente entre diferentes analitos e a fase móvel, isto é, a capacidade que um analito tem de se “dissolver” na fase móvel em relação a outro.

Eficiência ou número de pratos teóricos (N) – é o valor teórico exibido por uma coluna e representa a capacidade que uma coluna tem de definir um determinado analito. Isto é representado pela capacidade de separação e pela definição de cada um dos picos

registrados. Também afetam esta eficiência o fator de diluição representado pelas conexões internas do equipamento (tubulações).

A equação geral de resolução para uma cromatografia é descrita por uma equação:

$$R = \frac{1}{4} \left[\frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \right] (\sqrt{N}) \left[\frac{k'}{1+k'} \right]$$

Seletividade Eficiência Retenção

A figura 28.3 ilustra o mecanismo pelo qual as resinas de fase reversa (C4, C8, C18 etc.) atuam durante o

processo de separação das substâncias que estão sendo analisadas.

A figura 28.4 ilustra a diferença entre os parâmetros relacionados à capacidade de uma resina em separar os componentes de uma mistura.

Detectores

Outro avanço considerável que contribuiu para a elevada sensibilidade dos equipamentos de HPLC foi o desenvolvimento de detectores com capacidades de registrar quantidades mínimas de compostos presentes

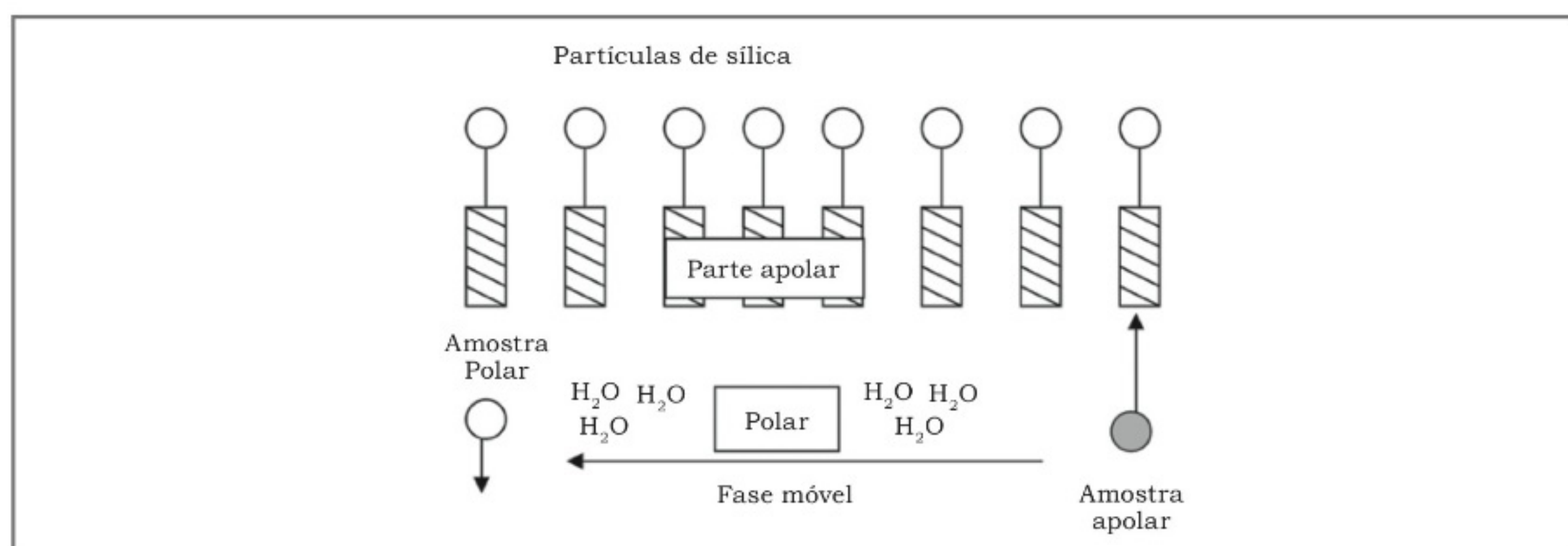


Figura 28.3 – Cromatografia em resinas de fase reversa, mostrando a interação do analítico com a fase móvel polar e a fase estacionária apolar.

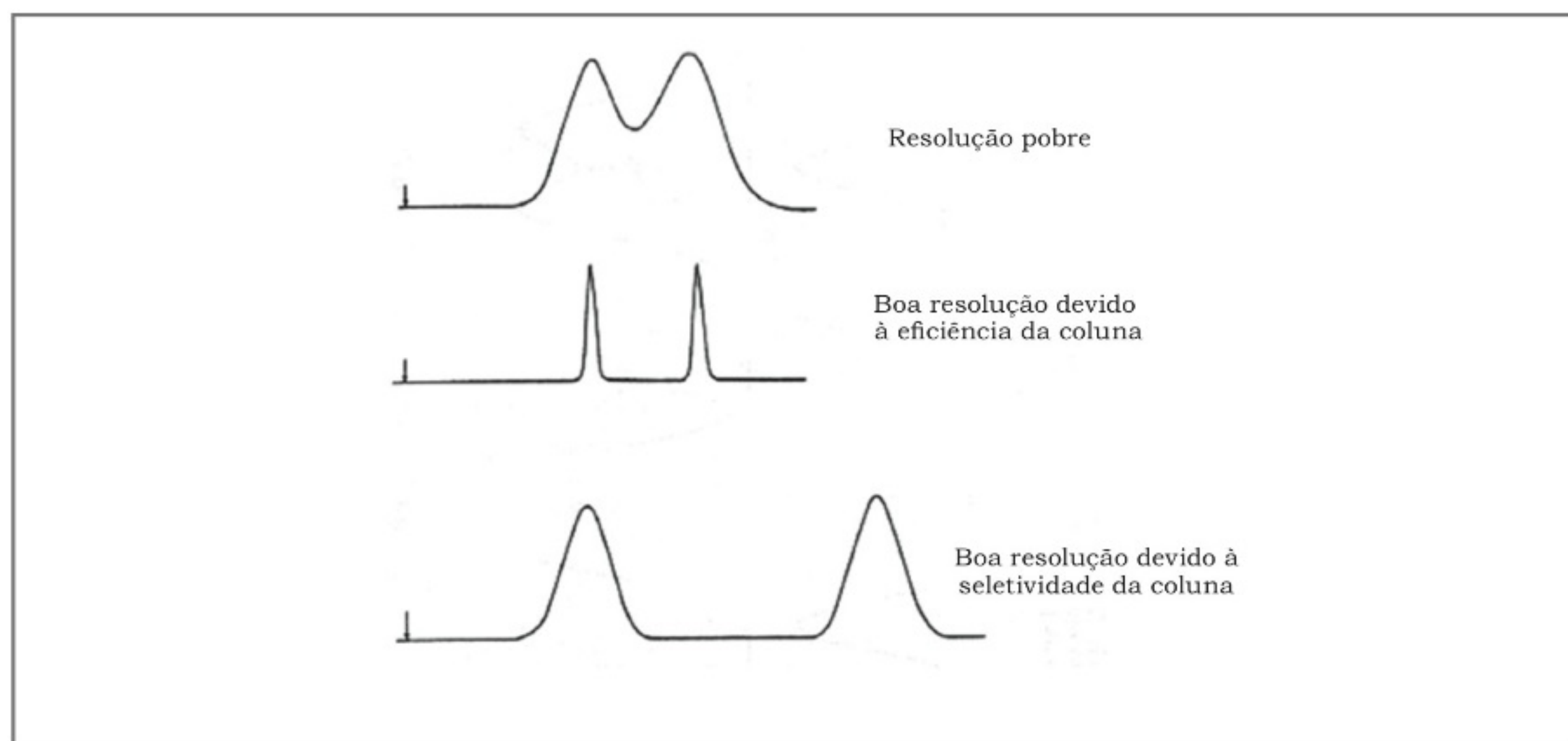


Figura 28.4 – Diferença na separação de componentes de uma mistura.

dentro de uma mistura a ser separada. Dentre os diferentes tipos de detectores podemos citar:

Detector espectrofotométrico ultravioleta-visível (UV-Vis) – este detector é o mais comumente utilizado e pode trabalhar com um comprimento de onda fixo no qual não há possibilidade de mudança do comprimento de onda, exceto com a troca do filtro, ou o de comprimento de onda variável (mais utilizado), que permite que se modifique o comprimento de onda dependendo da análise que será feita. Em alguns casos, é possível programar mudanças neste comprimento de onda em uma mesma corrida. O comprimento de onda pode variar de 190 a 400 nm (ultravioleta-lâmpada de deutério) até 400 a 700 nm (visível-lâmpada de tungstênio). O tamanho da cubeta de leitura nestes equipamentos normalmente varia de 8 a 14 microlitros e nos sistemas microanalíticos entre 2 e 3 microlitros, isto possibilita a leitura de volumes muito pequenos da amostra em um espaço diminuto, o que proporciona uma amplificação significativa do sinal que será gerada pela fotocélula. Esta cela é aberta, permitindo o fluxo contínuo de solvente através dela. Outra vantagem associada a este detector é seu custo e sua manutenção relativamente simples em comparação aos outros.

Detector espectrofotométrico de arranjo de diodos – é um desenvolvimento do detector UV-Vis, no qual, além da leitura em um comprimento de onda determinado, é possível se efetuar espectros de cada composto eluído no processo de separação. Com isto, além dos picos correspondentes a cada um dos componentes em determinado comprimento de onda, o analista terá um espectro de varredura UV daquele composto. É um detector muito utilizado nas indústrias química, farmacêutica e de alimentos.

Detector de fluorescência – este detector de configuração análoga ao detector espectrofotométrico tem como característica a possibilidade de efetuar a leitura de compostos capazes de emitir luz sob determinadas condições. Neste caso, é necessário ajustar dois comprimentos de onda em que o primeiro é denominado de excitação e faz com que as moléculas a serem analisadas fiquem no estado “excitado”, isto é, capazes de emitir fótons de luz; e o segundo comprimento de onda, designado de emissão, é o comprimento de onda no qual o fóton emitido é capaz de ser detectado pela fotocélula. Em muitos casos, quando não se conhecem esses valores, é possível de se obter no próprio aparelho o espectro de fluorescência de determinado composto através

da varredura espectral. Um fato que pode ocorrer é que em mistura complexa alguns compostos tenham uma emissão bastante significativa, enquanto outros não são capazes de provocar emissão. Neste caso, é preciso definir quais os compostos cuja fluorescência é mais importante e efetuar a leitura baseada nos comprimentos de excitação e emissão para este composto. A vantagem deste detector é sua elevada sensibilidade, cerca de 1.000 vezes maior do que a obtida com os detectores espectrofotométricos, isto é na faixa de picomolar (10^{-12} M), mas tem como principal desvantagem a de não registrar compostos que não emitem fótons como compostos orgânicos alifáticos, compostos inorgânicos em geral, e algumas moléculas orgânicas. Por outro lado, o ruído no sinal causado pelo solvente de eluição da amostra além de sais presentes nos tampões biológicos, podem inviabilizar a identificação da amostra.

Detector eletroquímico – baseia-se no princípio de que as substâncias podem sofrer processos de redução/oxidação; quando na presença de um eletrodo sob determinadas condições (corrente e tensão), estas variações podem ser detectadas comparando-se a uma cela de referência e este valor identificado como um pico. Normalmente, os eletrodos são de grafite, prata, ouro ou até platina. Trata-se de um detector dos mais sensíveis, abaixo inclusive do detector de fluorescência atuando na faixa de femtomolar (10^{-15} M) da substância, podendo identificar os mais diversos tipos de compostos. As principais desvantagens decorrem principalmente da elevada sensibilidade, o que acarreta um aumento no nível de ruído da linha de base e, principalmente, pela possibilidade dos processos redução e oxidação (red/ox) ocorrerem com os sais e compostos presentes na solução de eluição. Para minimizar esta interferência, é necessário efetuar um processo denominado de “passivação” do eletrodo, isto é, o solvente é recirculado pelo sistema até que todos os componentes do tampão já tenham passado pelo processo red/ox, e assim não será gerado nenhum sinal, e a linha de base se estabilizará, caso contrário, ocorreria um sem-número de picos correspondentes ao processo, impossibilitando a detecção adequada dos componentes da mistura que se quer separar. Outro problema é o da saturação do eletrodo, pois, por possuir uma superfície limitada, aos poucos vai havendo redução na capacidade do eletrodo de efetuar a reação red/ox em virtude do depósito de sais, ou ainda em virtude da concentração muito elevada de um determinado componente na mistura. Por este motivo, este é um detector mui-

to utilizado para fins analítico-diagnósticos e quase não utilizado em rotinas de purificação preparativa.

Detector por espectrometria de massas – trata-se de um sistema de detecção altamente sensível, chegando ao nível de atomol (10^{-18} M). Baseia-se no princípio obtenção da massa da molécula e de seus fragmentos pela ionização ou ainda pela nebulização em nitrogênio e aplicação de um campo magnético de valor elevado e em alto vácuo. Os componentes obtidos e seus fragmentos são detectados em uma placa metálica. A desvantagem desta metodologia, além do custo bastante elevado, é o da impossibilidade de se obter valores das quantidades de cada componente, obtendo-se basicamente a relação m/z (massa/carga) da molécula e dos seus fragmentos. Outra dificuldade é a de não se saber qual a natureza dos compostos, muito embora existam programas acoplados à máquina que podem sugerir as estruturas mais prováveis. Outro aspecto é que normalmente o equipamento trabalha em faixas reduzidas de peso molecular, ao redor de 2.500 Da, o que dificulta sua utilização para macromoléculas como proteínas e peptídeos. Na indústria químico-farmacêutica ainda não é muito utilizado, embora possa ter larga aplicação, em virtude do seu elevado custo.

Outros Detectores

Existem outros tipos de detectores que, em função do tipo de utilização ou em virtude do elevado custo, são empregados em menor escala entre eles podemos citar:

Detector de índice de refração – muito utilizado na indústria de polímeros e de açúcares efetua as medidas

dos compostos por meio da variação do índice de refração de um feixe luminoso. Sua desvantagem é a de não ser muito sensível, além do fato de que, muitas vezes para que a medida possa ser efetuada, é necessário aquecer/resfriar a amostra.

Existem ainda detectores de infravermelho e de ionização de chama para aplicações bastante específicas.

Uma possibilidade adicional é a de se conectar vários registradores com características diferentes em sequência, obtendo-se assim interpretações distintas para a amostra que está sendo separada.

Outro aspecto importante é o de que os detectores por espectrometria de massas e eletroquímico são destrutivos, isto é, para efetuar a detecção o composto é modificado ou destruído no processo e, portanto, não é recuperado para ensaios posteriores.

A tabela 28.1 ilustra as diferentes características de cada um dos registradores que podem ser acoplados a um sistema de HPLC.

Sistema de Tubulação para Conexão entre os Módulos

A passagem do solvente através dos diferentes módulos é efetuada pelo sistema de tubulação com as características a seguir.

Os tubos provenientes do reservatório de solvente até a admissão pelo sistema de bombas normalmente são de plástico especial ou teflon resistente a solventes orgânicos e ácidos fortes. Na extremidade que fica imersa no frasco de solvente normalmente é conectado um filtro de vidro sinterizado ou metal microporoso para evitar a entrada de partículas no sistema.

Tabela 28.1 – Principais detectores utilizados em cromatografia líquida.

Detector	Refratoramento (infravermelho)	UV/visível	Fluorescência	Espectrometria de massas	Eletroquímico (amperométrico)
Resposta	Universal	Moderadamente seletiva	Altamente seletiva	Universal	Altamente seletiva
Faixa de sensibilidade	Microgramas	Nanogramas	Picogramas	Fentogramas	Picogramas
Aplicação Principal	Polímeros Carboidratos	Farmacêuticos Drogas Aditivos	Poluentes Micotoxinas Vitaminas	Todos os compostos de até 3.000 D (ou superior, dependendo do detector)	Catecolaminas Fenóis

As conexões utilizadas das bombas para o injetor, deste para a coluna, dela para o detector e, finalmente, da saída do detector são tubos resistentes a solventes orgânicos e ácidos fortes, altamente resistente as pressões de trabalho do HPLC e com diâmetro interno bastante reduzido, para evitar volume morto dentro sistema e, conseqüentemente, reduzir a possibilidade de haver um processo de diluição durante a passagem da amostra e das frações isoladas no momento do processo de purificação ou análise. O diâmetro interno pode variar de 0,13 mm a 1,02 mm, correspondendo a um volume interno por cm de 0,13 μ L a 8,11 μ L, respectivamente. Os materiais empregados para confecção desta tubulação normalmente são o aço inox ou um plástico altamente resistente designado *peek*.

Sistemas de Registro e Integração

Os sistemas de registro ou de integração são conectados logo após o detector. O sinal gerado na cela de leitura, embora de pequena magnitude, é amplificado podendo então ser registrado em equipamentos convencionais como registradores potenciométricos, integradores ou ainda sistemas informatizados (PCs) que possuem sistemas de reconhecimento, tipo analógico-digital integrados a programas que permitem trabalhar os dados recebidos. Neste caso, é possível então visualizar o resultado da separação de uma mistura efetuar a identificação dos componentes, sua quantidade, natureza química etc. Os dados registrados vão depender do(s) tipo(s) de registrador(es) que está(ão) sendo utilizado(s).

Outros Módulos que podem ser Utilizados

Dependendo da utilização, é possível acoplar outros módulos ao sistema de HPLC com vistas à obtenção de um sistema com melhores características, obviamente isto irá representar um custo adicional que nem sempre se justifica. Entre os módulos mais comuns que podem ser encontrados podemos citar:

Módulo para injeção automática de amostras – efetua automaticamente a injeção das amostras para a coluna. Pode ser ajustado para diferentes volumes que variam desde 1 μ L até vários mL. É um módulo muito utilizado quando se tem um número elevado de amostras para analisar, particularmente em rotinas de laboratórios de controle ou análises químicas e clínicas.

Módulo para termostatização da coluna – permite aquecer ou resfriar a coluna, dependendo da necessidade do operador. Existem módulos só para aquecimento

ou para resfriamento ou ainda que acomodam de três até seis colunas diferentes; neste caso há uma chave seletora para a coluna que se que utilizar.

Módulo para degaseificação de solventes – em função da necessidade de eliminar todo o gás que possa estar dissolvido no solvente, foi desenvolvido um degaseificador automático de solventes. Este módulo é acoplado entre os frascos de solvente e o sistema de bombeamento e remove todo o gás do solvente ou pelo borbulhamento de hélio na solução ou por meio da passagem do solvente por membranas semipermeáveis e aplicação de ultrassom. A vantagem é que não há possibilidade de dissolução de gases durante rotinas de trabalho muito longas.

Módulo para coleta automática de frações – foi desenvolvido para efetuar automaticamente a coleta dos picos separados após a leitura do composto na cela do detector. Como depende diretamente do sinal obtido no detector, é fundamental, para que a coleta seja efetuada de forma correta, que os parâmetros sejam adequadamente ajustados. Normalmente, o material é coletado em tubos ou placas de acrílico com orifícios (semelhantes às placas de ELISA).

Solventes Utilizados em HPLC

Conforme já foi dito, é necessário que o solvente a ser utilizado na cromatografia seja de excelente qualidade e, nas condições de uso, apresentar “transparência”. Além destas qualidades, deve também apresentar outras características, conforme descrito na tabela 28.2.

A tabela 28.3 descreve as propriedades físico-químicas dos principais solventes utilizados em cromatografia líquida.

Acessórios Utilizados em Análise Cromatográfica

- Seringa de injeção especial para HPLC (agulha sem ponta).
- Filtros para solventes aquoso e orgânico (0,45 μ m).
- Filtros para amostra (baixo índice de retenção e volume morto reduzido).

No caso de não haver módulo para degaseificação de solventes:

- funil de três peças para acoplar o filtro para solventes;
- kitassato de 500 mL, 1 litro de volume compatível com a quantidade de solvente que será filtrada;

Tabela 28.2. Requisitos para a utilização de um solvente orgânico para HPLC.

1. Deve ser na medida do possível de baixo custo
2. Deve apresentar transparência em UV (pelo menos na faixa de 215 nm)
3. Deve apresentar baixa toxicidade
4. Deve ser um bom solvente para modificadores iônicos (por exemplo, fosfatos)
5. Efetivo em baixas concentrações
6. Não deve destruir a atividade biológica
7. Deve estar disponível em elevado grau de pureza
8. Não deve sofrer decomposição rápida
9. Preferencialmente volátil (para estudos preparativos)
10. Apresentar baixa viscosidade (baixa pressão de bombeamento e alta eficiência de separação)
Exemplos
1. Metanol, isopropanol, propanol
2. Acetonitrila (que é o mais indicado)
3. Etanol e outros álcoois
4. Acetonitrila e metanol
5. Propanol, isopropanol, dioxano e tetraidrofurano
6. Etileno glicol, isopropanol, 2-metoxietanol
7. Metanol, acetonitrila, piridina e outros álcoois
8. Dioxano e tetraidrofurano são problemáticos devido à formação de peróxidos, os álcoois podem ser rapidamente oxidados, como, por exemplo, isopropanol para acetona, e a acetonitrila decompõe-se lentamente na presença de ácidos
9. Metanol e acetonitrila
10. Metanol e acetonitrila

- bomba de vácuo;
- ultrassom;
- tubos de ensaio para a coleta do material que será separado.

Realizando a Cromatografia

Preparo dos Solventes

Em função da elevada sensibilidade apresentada pela maioria dos detectores e pelo diâmetro micrométrico de seu sistema de condução, é fundamental que os solventes e sais sejam da melhor qualidade, de preferência grau cromatográfico que é o indicado para esta finalidade ou então pró-análise (PA) de marca já tradicio-

nal com especificações necessárias para cromatografia. A água utilizada para o preparo das soluções deve ser de padrão cromatográfico (por exemplo, ultrapura ou superior). Os frascos utilizados no preparo das soluções devem ser muito bem lavados, não contendo resíduos de detergentes ou nenhum outro material. As soluções após o preparo devem ser filtradas e deaeradas através de vácuo e ultrassom, e os recipientes colocados no aparelho e tampados para que não haja partículas de poeira durante a cromatografia.

Outro aspecto importante é a “transparência” do solvente, isto é, levando-se em conta o tipo de detector que será utilizado, bem como o comprimento de onda ou outro parâmetro de calibração. É fundamental que nestas condições o solvente ou tampão não tenha

Tabela 28.3 – Propriedades físico-químicas de alguns solventes utilizados em HPLC.

Solvente	PM	Densidade g/mL	Viscosidade cP, 20°C	Toxicidade	Índice de Refração (n 20°C)	Transparência no UV (nm)	Temperatura de ebulição °C	Solubilidade em água
n-Pentano	72,15	0,626	0,23	500	1,36	200-210	36	i
n-Hexano	86,18	0,66	0,31	500	1,38	200-210	69	i
Ciclohexano	84,17	0,779	0,94	300	1,43	210	81	i
Tetracloro de Carbono	153,82	1,594	0,97	10	1,47	265	77	i
Diclorometano	84,94	1,326	0,44	200	1,42	233-245	41	i
Tetraidrofurano	72,1	0,888	0,55	150	1,41	222-230	66	n
Acetona	58,08	0,792	0,32	1000	1,36	330	56	a
Dioxano	88,11	1,035	1,32	100	1,42	215-220	101	
Etilacetato	88,1	0,901	0,45	400	1,37	255-260	77	a
Metilacetato	74,08	0,934	0,37	200	1,36	260	57	a
Pentanol	88,16	0,814	4,1	1,41	1,41	210,215	37	i
Dimetilsulfóxido	78,11	1,101		22	1,48	270	190	a
Nitrometano	61,04	1,130	0,67	100	1,38	380	101	a
Dimetilformamida	73,1	0,944	10 ^c	1,43	270	56	a	
Acetonitrila	41,05	0,783	0,37	40	1,34	190,210	82	a
Piridina	79,1	0,982	0,93	5	1,51	305	115	a
n-Butanol	74,12	0,809	3,0	100	1,40	215	117	i
n-Propanol	60,11	0,803	2,3	200	1,38	210	97	a
Isopropanol	60,11	0,789	2,3		1,38	207-210	82	a
Etanol	46,07	0,789	1,2	1000	1,36	208-210	68	a
Metanol	32,04	0,791	0,6	200	1,33	208-210	65	a
Ácido acético	60,05	1,049	1,26	10	1,37	230-255	118	a
Etanolamina	61,08	1,018		3				a
Etilenoglicol	67,02	1,109	19,9		1,43	210	198	a
Formamida	45,04	1,134	3,5		1,45	210	210	a
Água	18,02	0,998	1,0		1,33	200	100	a

n = não miscível; a = alta; i = imiscível

absorção ou que esta seja mínima, pois só assim será possível a detecção do material a ser analisado.

O equipamento deve ser ligado, a coluna conectada ao sistema, o comprimento de onda ajustado, tudo isto sem o bombeamento do solvente. Após esta etapa, o equipamento é colocado no modo “purga”. É aberta a válvula de “purga” das bombas e a operação iniciada. O objetivo desta operação é remover o solvente antigo presente ainda na câmara de bombeamento, bolhas etc. Terminada a operação, o fluxo de solvente é interrompido e as válvulas são fechadas. Inicia-se o incremento do fluxo até o volume desejado para a cromatografia, de forma gradual, para que este incremento não acarrete dano à coluna. O sistema deve ser equilibrado. O tempo para o equilíbrio é variável e depende fundamentalmente da sensibilidade do detector, variando de alguns minutos a algumas horas. As condições para eluição do material devem ser programadas de acordo com o equipamento.

É possível, então, injetar a amostra a ser separada ou analisada, e não esquecer de efetuar a filtragem da amostra que será injetada. No caso do injetor automático, esta operação é efetuada de acordo com a programação que foi inserida pelo operador; no caso da injeção manual, o volume a ser injetado é colocado na seringa, com muito cuidado para que não sejam injetadas bolhas de ar; qualquer microbolha na cela de 8 μL do detector será detectada como “um pico” e registrada como tal.

Observamos a corrida e por meio do registro fazemos a coleta dos picos ou podemos verificar os resultados da análise.

Após a corrida é sempre recomendável efetuar um período de lavagem.

Etapas para o Desenvolvimento de uma Cromatografia por HPLC

Escolher o detector a ser utilizado, bem como o melhor comprimento de onda ou ajuste para a leitura dos picos, para isto é necessário ter-se uma ideia da concentração da amostra que será injetada.

Escolher a coluna cromatográfica que melhor se adapte à cromatografia que se quer realizar dentro dos parâmetros de eficiência, seletividade e capacidade. Para isto, é importante conhecer algum item sobre a natureza química dos componentes da mistura (se são polares, apolares, macromoleculares etc.).

O solvente a ser utilizado na eluição deve ser compatível com os componentes da mistura, evitando pre-

cipitados, e adequar a matriz da resina da coluna de tal forma que o solvente escolhido possa auxiliar nas interações químicas, melhorando a capacidade e eficiência da coluna.

Ajustar o fluxo de solvente de modo que as interações solvente/matriz da coluna possam ocorrer. Fluxos muito rápidos impedem esta interação e fluxos muito lentos tendem a alargar os picos em função de uma eluição muito lenta dos componentes retidos na matriz da coluna.

No caso de cromatografia em um sistema de gradiente no qual há a mistura de dois ou mais solventes, as variáveis adicionam-se a cada um dos solventes presentes, assim:

- Fluxos elevados impedem a interação adequada entre a matriz, a amostra e os solventes, comprometendo toda a corrida.
- Fluxos muito lentos tendem a alargar aqueles picos nos quais os componentes interagem de forma mais intensa com a matriz da coluna e um determinado solvente.

No caso de gradiente binário, se o cromatograma apresenta baixa resolução no início, é necessário aumentar o tempo de gradiente para as condições iniciais ou ainda diminuir o fluxo neste intervalo. O mesmo pode ser dito se o problema ocorrer no final do gradiente, apenas que os parâmetros serão alterados no final da corrida.

Podem-se alterar ainda os valores da mistura de cada um dos solventes, por exemplo: no caso de picos muito juntos no início, pode-se reduzir o valor do percentual do solvente B na mistura, e se os picos aparecerem muito juntos no final da corrida, pode-se aumentar o percentual de B na mistura. Nestas condições, é necessário incrementar o tempo de corrida na proporção da alteração dos parâmetros.

A tabela 28.4 ilustra alguns dos fluxos característicos relacionados ao diâmetro interno de diversas colunas necessários para obter a melhor resolução em cada um dos casos, começando pelas características das colunas, como também relativamente aos procedimentos.

Outro aspecto que deve ser considerado é o da quantidade de material que se quer injetar no cromatógrafo neste caso podemos separar as cromatografias em analíticas e preparativas. Na tabela 28.5 podemos ver as principais diferenças existentes em um procedimento analítico e outro preparativo e os ajustes.

Tabela 28.4 - Fluxos típicos para diferentes colunas.

Coluna (diâmetro interno)	Fluxo em mL/min
2 mm	0,5 a 2
3 mm	2
4 mm	2 a 3
8 mm	4 a 10
10 mm	10 a 20

Tabela 28.5 – Principais diferenças entre parâmetros físicos e operacionais.

Parâmetros físicos	A HPLC analítico	B HPLC preparativo (alta capacidade de amostra)
Comprimento, cm	25-100	25-200
Diâmetro interno, mm	2-4	~ 8
Suporte:		
Diâmetro, microns	5-40	10-20
Área de superfície	Moderada a alta	alta
Fase móvel	Não viscoso	Volátil
	Grau espectral	Grau espectral
Fase estacionária	Filme fino	Alta capacidade de ligação
Partição	Atividade uniforme	Elevada área de superfície
Adsorção	Filme fino	Elevada capacidade, menor ligação cruzada
Troca iônica		
Exclusão	Gel rígido	Gel poroso
Parâmetros operacionais		
Gradiente	Preferencialmente amostras complexas	Preferencialmente amostras complexas
Fluxo, mL/h	30-120	200-400
Pressão, psi	500-5.000	500-5.000
Temperatura	Otimizar para reprodutibilidade e resolução	Aumentar para elevar a solubilidade
Tamanho da amostra, µg	0,050 a 500 (valor às vezes acima do ótimo)	Acima de 500
		Por injeção

Adaptado de Johnson E.L. e Stevenson R. – Basic Liquid Chromatography Varian Assoc. Inc, 1978.

Alguns Problemas Comuns que podem Ocorrer na Cromatografia por HPLC

1. O detector não liga – verificar a voltagem ou se há um fusível queimado.
2. O detector liga, mas não há sinal da amostra – a amostra pode ter sido perdida no injetor, pode haver vazamentos ou ainda a lâmpada está queimada e necessita troca.
3. A bomba não funciona ou não bombeia – o pistão pode estar travado ou pode haver ar dentro da câmara de admissão.
4. O registro da linha de base não zera – o solvente utilizado pode ser incorreto, de baixa qualidade; pode estar havendo eluição de substâncias retidas na coluna de cromatografias anteriores, ou ainda, a cela do detector pode estar suja.
5. Saem muitos picos em sequência – pode haver bolhas no sistema ou dentro da cela de leitura do detector.
6. A pressão do sistema oscila – bolhas no sistema ou vazamentos em algumas das linhas.
7. Com volumes idênticos de injeção os picos saem com tamanhos diferentes – pode estar havendo perda de material pelo injetor.
8. A pressão do sistema aumenta após a injeção – pode estar havendo precipitação do material.
9. A pressão do sistema está alta – existe entupimento em algum ponto da linha de condução de solvente ou a coluna está entupida.
10. Os picos estão pouco definidos ou muito largos – a coluna está velha; as condições de cromatografia estão inadequadas; o diâmetro da linha de condução do solvente é muito grande ou a quantidade injetada é superior ao suportado pela coluna.

Referências

- Johnson, E.L.; Stevenson, R. Basic Liquid Chromatography. Varian Associates Inc., 1978.
- Snyder, L.R.; Kirkland, J.J.; Glajch, J.L. *Practical HPLC Method Development*. 2nd ed. Wiley Interscience Pub., 1997.
- Sofer, G.; Hagen L. Handbook of Process Chromatography. Academic Press, 1977.
- Swadesh, J. HPLC – Practical and Industrial Applications – CRC Press, 1997.

29. HPLC – para Análise de Aminoácidos

Ivo Lebrun

Introdução

A análise de aminoácidos é um método qualitativo e quantitativo que possibilita a identificação e a quantificação de aminoácidos provenientes de um material biológico que contenha proteínas, peptídeos ou mesmo aminoácidos livres. O método baseia-se em uma reação de acoplamento do aminoácido com um cromóforo, isto é, um composto químico que possibilita que o aminoácido absorva luz em determinado comprimento de onda; em alguns casos, o composto pode ser um fluoróforo, que é capaz de emitir fluorescência e, neste caso em particular, a detecção é efetuada por fluorescência. O método é bastante simples e reproduzível, necessitando apenas de um equipamento de cromatografia líquida isocrático (com uma bomba) e um detector de ultravioleta (UV) variável. Podem ser utilizados sistemas de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com gradiente e, se houver necessidade, sistemas totalmente automatizados. A sensibilidade do método pode ser de até 1-2 nmoles ou se o sistema estiver otimizado de até 20 a 50 pmoles.

Sua vantagem em relação a outras metodologias é a alta sensibilidade aliada a um baixo custo de execução se considerarmos as outras metodologias para a determinação da estrutura de proteínas e peptídeos, como o sequenciamento automático utilizando a degradação de Edman; ou mesmo a espectrometria de massas que requer equipamentos significativamente mais dispendiosos. Como principal desvantagem a metodologia não oferece a sequência dos aminoácidos nos peptídeos e proteínas, sendo de valor discutível quando o objetivo é o da determinação da estrutura primária do composto. Entretanto, se a proteína já foi descrita ou apenas a composição em aminoácidos é informação suficiente, o método é bastante recomendável. As informações contidas neste capítulo pressupõem que o analista já possua um conhecimento prévio da utilização de sistemas de

HPLC, caso contrário é recomendável, para uma adequada compreensão dos aspectos específicos, uma leitura prévia relacionada a este equipamento e às características das colunas de fase reversa que serão mencionadas mais adiante (ver Cap. 28).

Aspectos Históricos

As primeiras análises de aminoácidos baseavam-se em técnicas de cromatografia em camada delgada ou eletroforese de alta voltagem em papel e reveladas através de reações orgânicas, como, por exemplo, ninidrina, ou ainda com reagentes específicos como o paradimetil aminobenzaldeído (Trp), alfa-nitroso-beta-naftol (Tir) etc., quando os componentes das matérias orgânicas foram inicialmente estudados. A partir daí, verificou-se que a informação contida na matéria viva se resumia a uma sequência variável de 22 aminoácidos que quimicamente podiam ser classificados como neutros, básicos e ácidos, conforme seu potencial em solução e que estes aminoácidos eram sempre do tipo levógiro. Posteriormente, foram identificados no reino vegetal e em bactérias compostos com outros tipos de aminoácidos ou ainda com alguns do tipo dextrógiro (d), mas na grande maioria dos casos as proteínas e os peptídeos que constituem as células e material vivo só são ativos quando constituídos de aminoácido do tipo levógiro. A identificação destes aminoácidos era feita, inicialmente, por meio da sua separação em placas de sílica gel ativada ou papel de filtro especial. Após a corrida de separação eram borrifados reagentes (cromóforos) que reagiam com os aminoácidos. Desta reação resultavam manchas (*spots*) que caracterizavam cada um dos aminoácidos, sendo que a intensidade da coloração adquirida indicava maior presença de determinado aminoácido. Estes métodos tinham como desvantagens baixa sensibilidade, eram bastante demorados e o resultado nem sempre satisfatório, além do risco de se lidar com alta voltagem

e solventes orgânicos bastante tóxicos. Uma evolução para este método na década de 1960 foi a utilização da reação de dansilação e cromatografia em placa de poliamida, que melhorou a sensibilidade e facilitou a identificação dos aminoácidos através da luz ultravioleta. Com o desenvolvimento de resinas cromatográficas de melhor resolução e com características químicas mais adequadas foi desenvolvido, no final da década de 1960, um dos primeiros sistemas automatizados para análise de aminoácidos de forma rotineira. O equipamento baseava-se em um sistema de colunas cromatográficas de troca iônica (poliestireno sulfonado) que eram capazes de separar os diferentes tipos de aminoácidos, os quais eram revelados com ninidrina por meio do bombeamento do reagente no sistema e passagem da mistura reacional em serpentina imersa em banho aquecido. Os aminoácidos eram identificados por meio de leitura em espectrofotômetro, conforme seu tempo de retenção, sendo que a intensidade da absorção refletia a concentração do aminoácido. Pode-se dizer que este método possibilitou, de forma rotineira, as primeiras análises, e sua sensibilidade bem como sua reprodutibilidade eram bastante satisfatórias. A principal desvantagem era o tempo dispendido para uma única análise, aproximadamente 18 a 24 horas, o que limitava muito sua utilização em rotinas cujo número de amostras era muito elevado, sendo a sensibilidade da ordem de μMol de aminoácido.

No final dos anos 1970 e início dos anos 1980, com o desenvolvimento de resinas de sílica altamente seletivas e resistentes a elevadas pressões e com a construção de bombas de excelente precisão de bombeamento em alta pressão, iniciou-se a era da análise por cromatografia líquida de alto desempenho, também conhecida como HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Este equipamento permitiu o desenvolvimento de metodologias sensíveis, reprodutíveis e rápidas, as quais são utilizadas atualmente de forma rotineira em diversos ambientes: laboratórios de pesquisa, indústria de alimentos, laboratórios clínicos etc. A tabela 29.1 ilustra o código de três e de uma letra utilizado para a identificação dos principais aminoácidos encontrados nos materiais biológicos.

Tabela 29.1 – Símbolos dos aminoácidos.

A	Ala	Alanina
C	Cis	Cisteína
D	Asp	Ácido aspártico
E	Glu	Ácido glutâmico
F	Fen	Fenilalanina

G	Gli	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lis	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Trconina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
Y	Tir	Tirosina

Análise de Aminoácidos por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC)

A análise do conteúdo de aminoácidos em um material biológico, antes da parte analítica propriamente dita, pode ser dividida em duas etapas. A primeira consiste no preparo da amostra, uma vez que os materiais biológicos apresentam diferenças bastante significativas entre si e, neste caso, podemos incluir também uma etapa de digestão do material ou hidrólise. Na maioria dos casos, os aminoácidos a serem analisados encontram-se na forma ligada, isto é, formando ligações peptídicas para resultar em proteínas ou peptídeos. Para a identificação adequada dos aminoácidos presentes, é necessária uma etapa que libere os aminoácidos, que constituem estas proteínas ou peptídeos, seria como desmanchar o quebra-cabeças em suas peças. Esta etapa normalmente é efetuada pela ação de ácidos fortes, como o ácido clorídrico ou fosfórico, em temperatura elevada, 180°C . Para que não haja evaporação do ácido no processo, o material é colocado em frascos ou ampolas hermeticamente fechados. O tempo de hidrólise é variável e depende de alguns fatores que citaremos mais adiante, mas em geral dura de 6 a 18 horas. Existem já no mercado estações de trabalho (*workstations*), como a *picotag* Waters Inc., que aceleram o processo de hidrólise, mas tem o inconveniente do custo, no primeiro caso basta uma estufa de secagem bem regulada.

A segunda etapa, após a hidrólise, consiste na eliminação do ácido residual por meio de secagem e lavagens

sucessivas até o pH próximo de neutro e da reação de derivatização ou acoplamento. Esta reação é que possibilita, por meio do acoplamento com um cromóforo ou fluoróforo a identificação do aminoácido em determinadas condições. Discutiremos as vantagens e, desvantagens de cada uma das reações mais adiante.

O material assim obtido é então aplicado em um sistema de cromatografia e o resultado da análise é comparado com um padrão de aminoácidos de concentração conhecida. Este padrão pode ser obtido comercialmente de diversos fornecedores ou confeccionado pelo próprio pesquisador ou analista. No segundo caso, é necessário que a pesagem seja analítica e que os reagentes sejam de alta qualidade (pró-análise, no mínimo). A técnica de separação dos aminoácidos deve ser adequadamente padronizada e, a partir deste momento, altamente reproduzível. O equipamento básico para a obtenção da análise está descrito conforme esquematizado na figura 29.1. É importante ressaltar que existe um sem-número de metodologias descritas para um sem-número de análises de diferentes tipos de material e, neste caso, é interessante que o pesquisador ou analista procurem a metodologia que melhor se ajuste à sua análise em particular. Didaticamente, procuraremos descrever a metodologia mais geral para este fim e aquela que se aplica na maioria dos casos.

Na figura 29.1 temos diagramas ilustrando as diferentes configurações para sistemas HPLC.

Os dois principais métodos que poderão ser utilizados para a identificação e quantificação de aminoácidos são:

1. Baseado na derivatização do aminoácido com fenilisotiocianato de potássio, sendo os aminoácidos identificados por UV a 254 nm;
2. Utiliza a derivatização com orto-ftalaldeído e os aminoácidos são identificados por fluorescência em excitação (Ex) 330 nm e emissão (Em) 450 nm.

Não faremos a descrição do método por ninidrina pois o mesmo possui menor sensibilidade, embora, ainda seja adotado pela farmacopeia brasileira e por agências reguladoras.

Os métodos podem ser divididos em quatro etapas principais:

1. Hidrólise;
2. Reação de derivatização;
3. Análise propriamente dita;
4. Identificação dos aminoácidos e cálculo das concentrações.

ETAPA 1 – Hidrólise da Amostra

Material a ser Utilizado:

- Estufa de secagem com capacidade para 180°C.
- Frascos ou ampolas para hidrólise do material.
- HCl a 6 N ou ácido p-tolueno sulfônico a 3 N.
- Fenol.
- Nitrogênio ou sistema de vácuo.
- Pipetas automáticas de precisão.
- Bomba de vácuo.
- Dessecador.

A primeira etapa consiste na hidrólise do material a ser analisado. Em muitos casos, quando se quer analisar o conteúdo de aminoácidos livres, como no caso de materiais biológicos (líquor, plasma ou tecidos), após a remoção da proteína total por precipitação ou filtração, ou ainda em meios de cultura, alimentos etc., a dosagem pode ser feita diretamente excluindo-se a etapa de hidrólise. Neste caso em particular, somente a fração em aminoácidos livres presentes no material é que será quantificada à fração ligada (proteínas e peptídeos ou outros compostos que têm em sua composição aminoácidos) não serão dosados. É conveniente que o material seja previamente neutralizado e filtrado, a fim de se evitar hidrólise incompleta ou formação de grumos ou precipitados durante o processo de hidrólise. A quantidade de material a ser hidrolisado varia de acordo com a concentração e o tamanho da molécula. Moléculas menores são hidrolisadas mais facilmente e em menor tempo (6-12 horas), enquanto proteínas macroglobulares são digeridas mais lentamente. Neste caso, é conveniente a hidrólise em vários tempos, uma vez que alguns aminoácidos como met, his e os aromáticos são parcialmente degradados após tempos de hidrólise prolongados. No caso de proteínas de composição desconhecida, é recomendável que se efetue uma hidrólise em paralelo de alguma proteína conhecida (por exemplo, albumina etc.). Após esta etapa, o material é colocado no frasco-ampola e adicionado de 1 mL de HCl 6 N ou ácido p-tolueno sulfônico a 3 N (Liu e Chang, 1971) juntamente com um microcristal de fenol. Esta solução é deaerada ou borbulhada com nitrogênio de forma a se eliminar todo o oxigênio. O oxigênio dentro do processo tende a formar subprodutos de aminoácidos oxidados, os quais na etapa de análise, aparecerão com subprodutos de determinado aminoácido, dificultando a interpretação do cromatograma. A ampola deve ser hermeticamente fechada ou selada pela chama de maçarico e então colocada na estufa a 180°C por 6 a 18 horas. Este tempo irá depender, fundamentalmente,

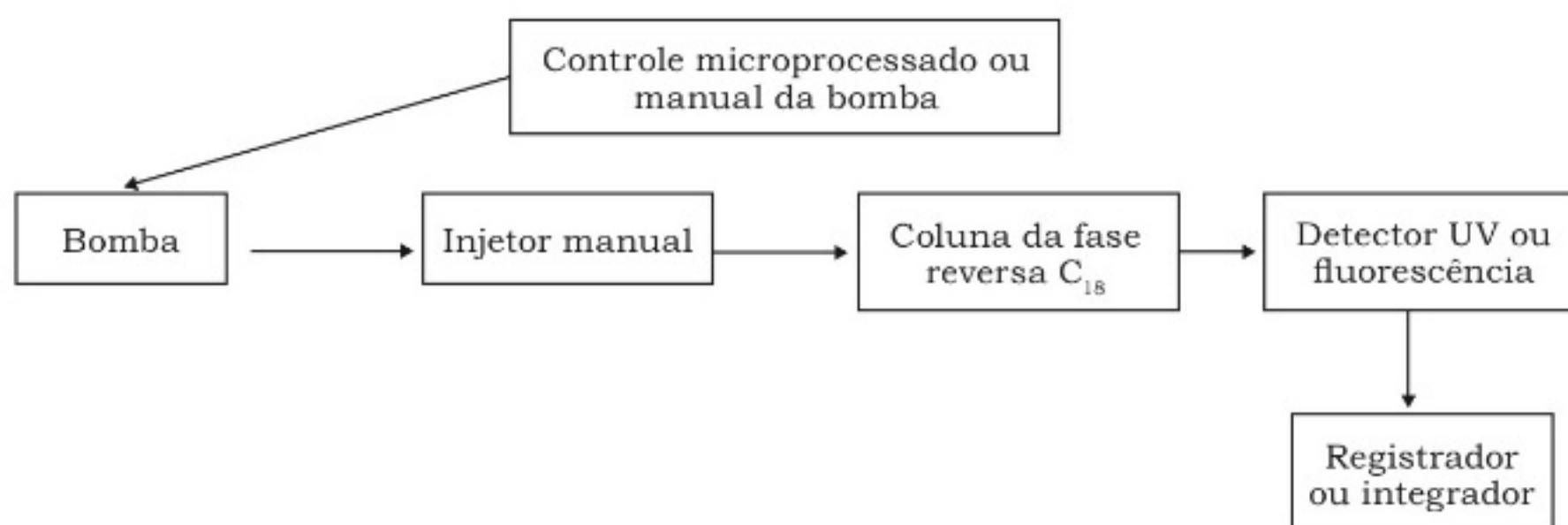
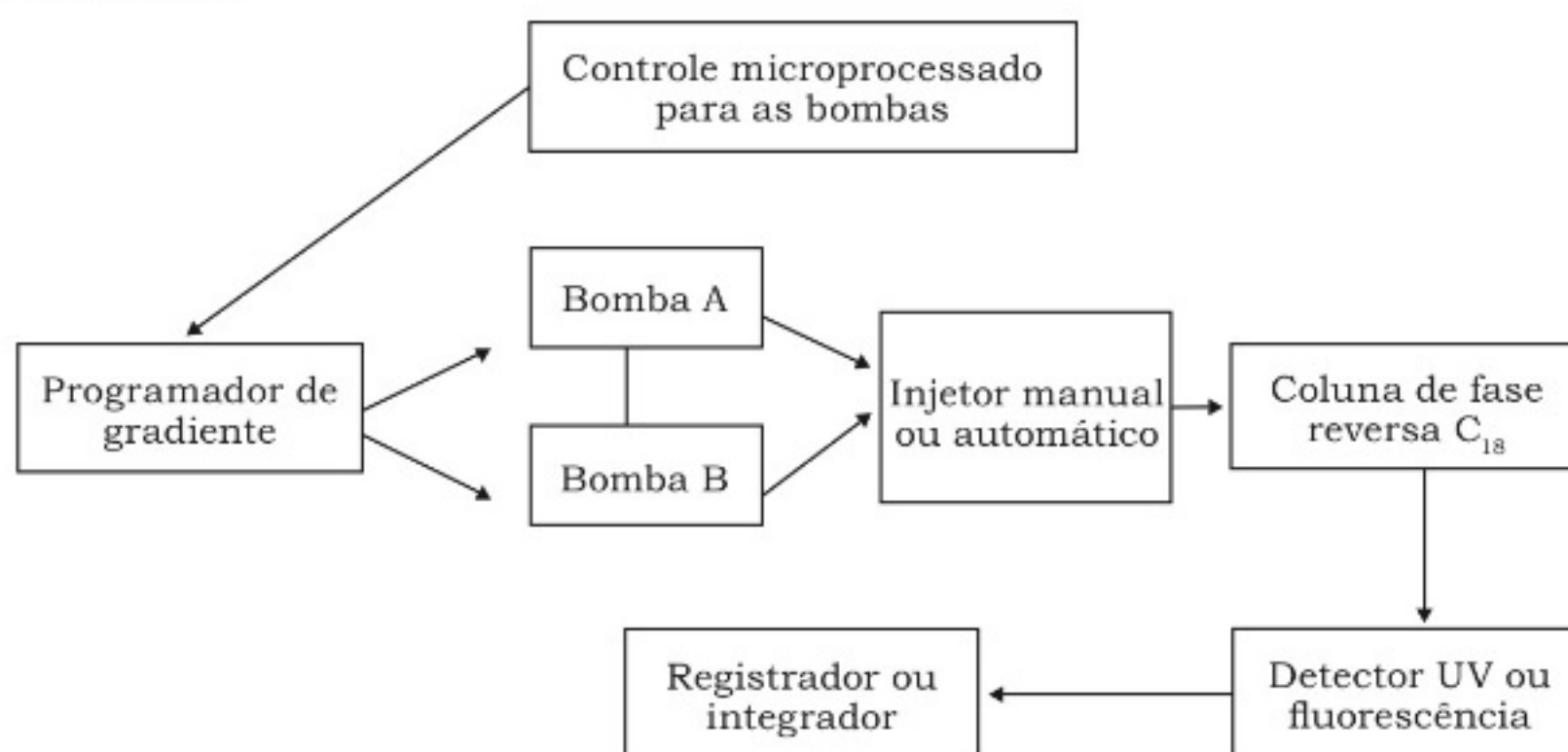
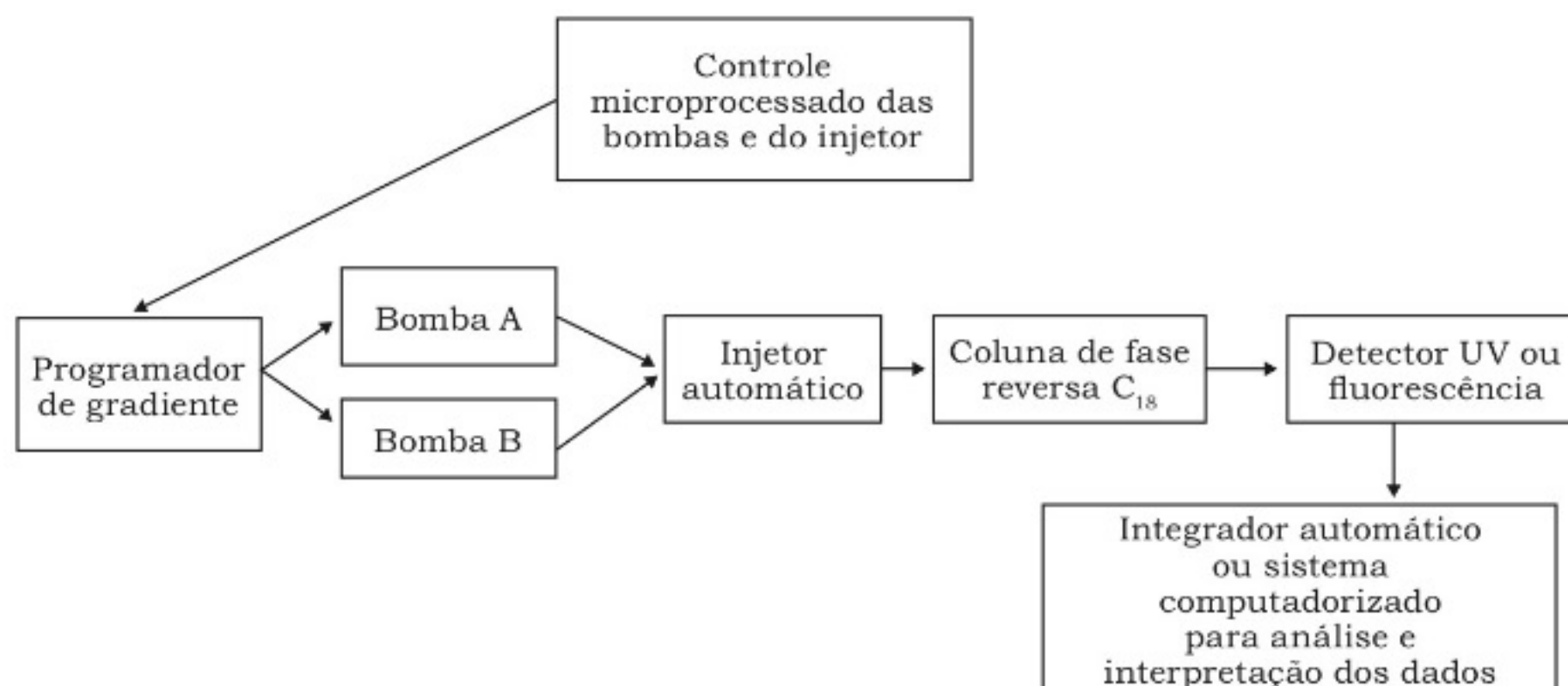
A Sistema isocrático simples**B** Sistema de gradiente**C** Sistema de gradiente totalmente automatizado

Figura 29.1 – Diferentes configurações para sistemas de HPLC. **(A)** Sistema isocrático simples; **(B)** sistema de gradiente; **(C)** sistema de gradiente totalmente automatizado.

do tamanho da molécula: quanto maior a molécula, maior será o tempo de hidrólise. Terminada a etapa de hidrólise, o restante do HCl não utilizado na reação é removido por lavagens sucessivas com água seguida por evaporação em dessecador a vácuo. Normalmente, três etapas são suficiente para remover completamente o excesso de HCl. O hidrolisado assim obtido está pronto para a etapa de derivatização. Uma desvantagem da utilização do HCl como hidrolítico é o conteúdo de triptofano perdido, já com o ácido p-tolueno sulfônico isto não ocorre; entretanto, a hidrólise é menos eficiente e o ácido em excesso não é passível de remoção por evaporação, devendo então ser neutralizado com base. Em alguns casos específicos, pode-se optar pela digestão enzimática do material por proteases inespecíficas, mas sempre há o risco de parte do material analisado ser originado da autodigestão da própria enzima utilizada no processo. É possível acelerar o processo de hidrólise efetuando-se a mesma reação por meio de HCl em fase gasosa ou da utilização de frascos especiais submetidos a hidrólise por microondas (Chiou e Wang, 1990). Neste caso, o tempo de hidrólise é reduzido a 8-12 minutos, acelerando muito a primeira etapa!

ETAPA 2 – Derivatização dos Aminoácidos

Material Necessário:

- Pipetas automáticas de precisão.
- Reagentes de derivatização.
- Agitador de tubos (vórtice).

A) Reação de Derivatização com Fenilisotiocianato de potássio (PTH)

Reagentes Adicionais:

- Fenilisotiocianato de potássio.
- Trietilamina.
- Etanol.
- H₂O deionizada ou padrão cromatográfico (água ultrapura).

A derivatização com fenilisotiocianato é uma reação de acoplamento onde o reativo fenilisotiocianato irá ligar-se ao NH₂ do aminoácido (Fig. 29.2). O composto formado irá gerar um derivado que absorverá no comprimento de onda de 254 nm. Desta forma, todos os aminoácidos terão absorção neste comprimento de onda de forma que é possível quantificá-los de uma só vez neste comprimento de onda. Como a absorção neste comprimento de onda para cada aminoácido não é exatamente igual em função da estrutura química de cada um, a mesma reação é efetuada com um padrão de concentração conhecida e o resultado é então comparado com este padrão.

Um aspecto importante para este tipo de derivatização é que o reativo deve ser preparado no dia de utilização não podendo ser estocado mesmo em geladeira ou *freezer*. A derivatização pode ocorrer por meio de um único acoplamento, neste caso teremos como derivativo um feniltiocarbamil-aminoácido enquanto que a reação feita em duas etapas dá origem a um feniltiohidantoína-aminoácido. A vantagem do acoplamento único é a rapidez com a qual o mesmo é feito e a desvantagem é

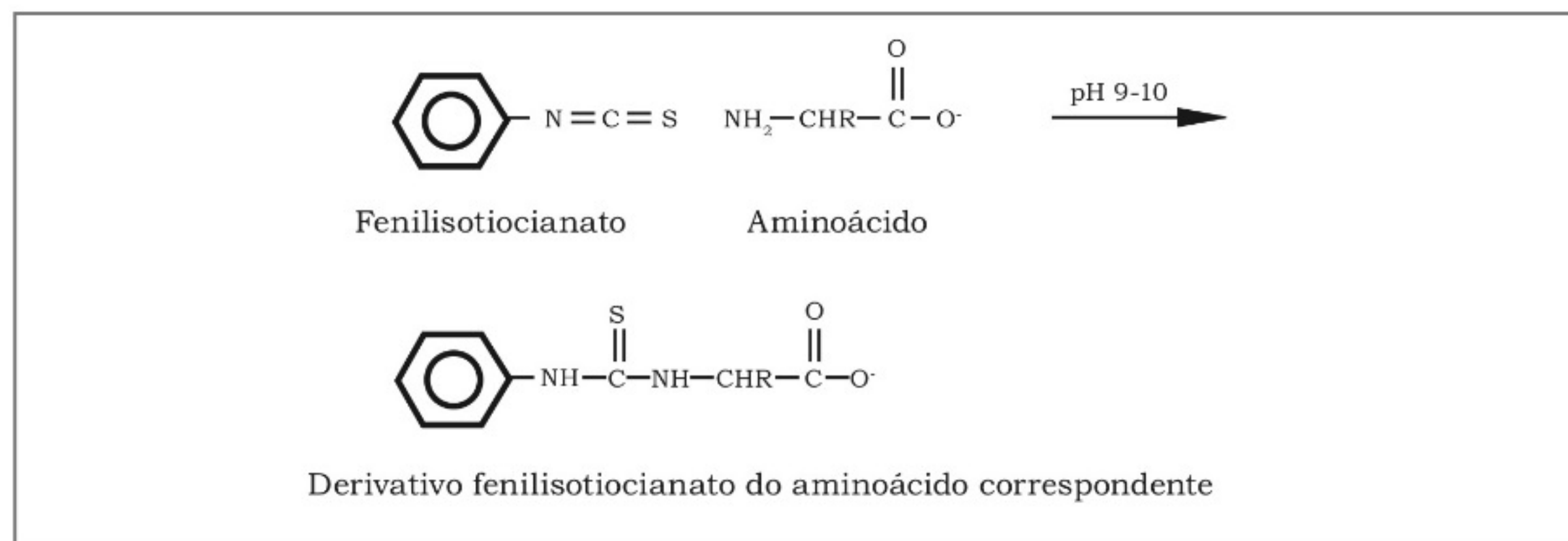


Figura 29.2 – Reação de acoplamento do fenilisotiocianato com o aminoácido, resultando no aminoácido derivatizado.

que o produto de reação é menos estável e portanto a determinação por HPLC deve ser efetuada no mesmo dia enquanto que no segundo caso o produto formado é mais estável podendo ser estocado em geladeira e revelado até três dias após a reação.

Esta derivatização é a mais comumente empregada por permitir que a quantificação dos aminoácidos seja feita através da utilização de um espectrofotômetro UV (Ebert, 1986); (Cohen e Strydom, 1988).

Procedimento:

Etapas de secagem – o material obtido após a hidrólise é secado a vácuo em dessecador contendo carbonato de cálcio anidro ou utilizando-se a unidade da estação de trabalho.

Etapas de lavagem – adicionar 10 µL da solução de lavagem e agitar em vórtice e efetuar a secagem. Esta

Quadro 29.1a – Solução de lavagem (redry).

Reagente	Volume em microlitros (µL)
Etanol	200
Água	200
Trietilamina	100

Esta solução é estável por um mês a – 20 °C

Quadro 29.1b – Solução de Derivatização.

Reagente	Volume em µL	Volume em µL	Volume em µL	Volume em µL	Volume em µL	Volume em µL
Etanol	70	140	210	280	350	700
Água	10	20	30	40	50	100
Trietilamina	10	20	30	40	50	100
Fenilisotiocianato	10	20	30	40	50	100
Volume final (µL)	100	200	300	400	500	1000

Homogeneizar a mistura no agitador de tubos vortex e aguardar em repouso por 5 minutos. A solução deverá ser utilizada num período de no máximo 2 horas.

Quadro 29.2a – Soluções alternativas para Derivatização – Reagente de Metanol.

Reagente	Volume em microlitros (µL)
Metanol	140
Água	20
Trietilamina	20
Fenilisotiocianato	20

etapa deve ser repetida até o ponto de não haver mais ácido clorídrico residual.

Reação de acoplamento – adicionar 20 µL da solução de derivatização, agitar em vórtice e manter a temperatura ambiente por 10 minutos. Se houver necessidade, secar a solução a vácuo ou efetuar a análise.

As soluções utilizadas para a reação de derivatização de aminoácidos com fenilisotiocianato estão descritas nos quadros 29.1a e 29.1b e as soluções alternativas para derivatização estão descritas no quadro 29.2a e 29.2b.

B) Reação de Derivatização com Ortoftalaldeído

Reagentes Adicionais:

Ortoftalaldeído.

Metanol.

Beta-mercaptoetanol.

Tetraborato de sódio.

O processo de derivatização consiste no acoplamento de um grupamento fluoróforo ao NH₂ do aminoácido, o qual será revelado em espectrofluorímetro com comprimentos de onda excitação (Ex) 330 nm emissão (Em) 450 nm. Todos os aminoácidos poderão ser identificados

Quadro 29.2b – Soluções alternativas para Derivatização – Reagente de Etanol polar.

Reagente	Volume em microlitros (µL)
Metanol	140
Água	40
Trietilamina	20
Fenilisotiocianato	20

e embora a emissão varie de acordo com a estrutura de cada aminoácido. Tanto a derivatização como a determinação dos aminoácidos após a derivatização devem ser efetuadas em sequência. Por não ser muito estável, o material deve ser revelado logo após a reação, cerca de 5 minutos. Como vantagem está a sensibilidade do método, e como desvantagem além de a reação e a revelação deverem ser feitas em sequência, o custo do detector fluorimétrico que muitas vezes não tem outra utilização no laboratório.

Procedimento de Derivatização dos Aminoácidos

A solução-estoque de derivatização é obtida dissolvendo-se 27 mg de OPA em 1 mL de metanol, acrescentando-se em seguida 5 µL de beta-mercaptoetanol e 9 mL da solução de tetraborato de sódio a 0,1 M (pH 9,3). Este reagente permanece em bom estado sempre que guardado em frasco âmbar bem selado, à temperatura ambiente, podendo ser utilizado por no máximo 5 dias.

Pelo menos 30 minutos antes da análise das amostras uma solução deve ser preparada diluindo-se 1 mL da solução-estoque com 2 mL da solução de tetraborato de sódio 0,1 µL. A derivatização pré-coluna é finalizada reagindo-se 100 µL desta solução com 50 µL da amostra ou da solução-padrão de aminoácidos, por exatamente 2 minutos, antes da injeção na coluna analítica, conforme metodologia descrita por Graser et al. (1985) e modificada por Donzati et al. (1988).

ETAPA 3 – Separação dos Aminoácidos por HPLC

Material Necessário:

Sistema de HPLC – isocrático (uma bomba), gradiente (duas bombas).

Coluna de fase reversa C18 – 250 mm × 4,6 mm ou 150 mm × 4,6 mm.

Sistema de aquecimento para coluna cromatográfica.

Solventes para eluição.

Filtros de amostra 0,45 µm.

Microseringa.

Seringa descartável para acoplar no filtro.

Detetor ultravioleta variável (para derivatização com fenilisotiocianato).

Detetor de fluorescência (para derivatização com orto-ftalaldeído).

Registrador ou sistema computadorizado para aquisição de dados.

A separação dos aminoácidos pode ser realizada por meio de um equipamento de HPLC equipado com uma coluna de fase reversa C₁₈ (250 mm × 4,6 mm). Em alguns casos é possível utilizar colunas de 150 mm de comprimento e obter resultados bastante satisfatórios, com redução significativa do tempo de análise. O tempo de análise varia de acordo com o número de aminoácidos presente na amostra, contaminantes do material e precisão com que se quer determinar cada um deles. O tempo médio é de 25 minutos, variando de 12 a 40 minutos, dependendo de cada caso. Esta variação depende fundamentalmente do sistema HPLC que será utilizado, ou seja, sistemas isocrático (uma bomba) ou de gradiente (duas bombas). Outro aspecto fundamental é a utilização de um sistema de aquecimento para a coluna que deverá ser mantida a 36-38°C. O aquecimento da coluna permite melhorar a resolução (separação) entre os picos de cada aminoácido, particularmente daqueles que são quimicamente muito assemelhados, como Ile e Leu, ou ainda Lys e Phe, que eluem no final do gradiente; variações no valor de pH da solução de HPLC também acarretam mudanças no padrão de eluição, particularmente com Asp e Glu, ou ainda Val e Met. Com a melhor definição de cada um dos picos que representa cada aminoácido, a área correspondente a cada pico de aminoácido ficará mais bem discriminada e, conseqüentemente, a concentração de cada um será determinada de forma mais precisa.

Os solventes a serem utilizados podem variar bastante e, em função desta grande variabilidade, é preciso que o analista faça as escolhas em função dos resultados que ele espera obter, assim como do custo que cada análise irá dispendar.

Assim, a utilização de metanol como fase móvel é interessante do ponto de vista do custo, mas apresenta maior variação e menor estabilidade que a acetonitrila.

Dessa forma, descreveremos algumas soluções mais comumente utilizadas para a separação dos aminoácidos.

Solução-tampão de Análise de Aminoácido

Acetato de sódio 19 g

Água padrão cromatográfico 1.000 mL

Trietilamina..... 0,5 mL

Solução de EDTA pH 8,0..... 200 µL

Titular pH 6,4 com ácido acético glacial e filtrar

Solução-estoque EDTA

100 mg de EDTA para 100 mL de H₂O padrão cromatográfico (sonicar para dissolver).

Gradiente para eluição dos aminoácidos derivatizados com PTH

Tempo (min)	Concentração	Fluxo
0-46 (25)	46	1,0
25-30	46-100	1,0
30-36	100	1,0
38	100	1,5
40	100	1,5
42	100	1,5
44	0	1,0

Temperatura 38°C

Solução A – 440 mL de solução Stock + 60 mL de Acetonitrila.

Solução B – 400 mL de Acetonitrila + 100 mL de H₂O + 100 µL EDTA (solução 100 mM).

Gradiente para eluição dos aminoácidos derivatizados com OPA

Preparo da fase móvel utilizada na quantificação dos aminoácidos.

Utiliza-se na eluição dos aminoácidos um sistema de gradiente de metanol com a fase móvel constituída por uma mistura de tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 5,5) acrescido de 0,03% de NaCl e metanol nas seguintes proporções: 20% para a fase móvel “A” e 80% para fase “B”. O programa de eluição utilizado pode ser:

Tempo (min)	Solvente A	Solvente B
0	100%	0%
10	90%	10%
30	75%	25%
35	100%	0%
45	100%	0%

Os últimos 10 minutos da programação são estabelecidos devido à necessidade de reequilíbrio do sistema, que opera com o fluxo constante de 1 mL/minuto e potencial de 0,8 V no eletrodo de trabalho, à temperatura ambiente.

A tabela 29.2 ilustra várias opções de utilização de solventes e de gradientes de solventes utilizados para a análise de soluções ou hidrolizados contendo aminoácidos.

O HPLC dotado de uma única bomba utiliza apenas um solvente e, com isso, obtém-se menor variação entre as análises; entretanto, o tempo em cada análise é menor e nos casos nos quais o material a ser analisado pode ser de diferentes origens (tecido, fluidos biológicos etc.) não é tão simples de se efetuar variações no procedimento de eluição dos aminoácidos. Isto é, para cada variação no solvente é necessário preparar uma nova solução, enquanto no HPLC dotado de sistema-gradiente basta alterar a programação do gradiente e efetuar uma nova corrida.

A figura 29.3 ilustra um padrão típico de análise de aminoácidos derivatizado com fenilisotiocianato. Dependendo da fase móvel utilizada, pode haver modificação na posição de alguns aminoácidos que poderá ser adequadamente caracterizada pela adição de um padrão interno daquele aminoácido que se quer identificar.

A tabela 29.3 ilustra o tempo de retenção relativo (*R*) dos aminoácidos relativamente à corrida cromatográfica. Este tempo pode sofrer modificações dependendo do gradiente utilizado.

ETAPA 4 – Identificação e Cálculo do Conteúdo de Aminoácidos

Após a cromatografia da amostra que deverá ser analisada e do padrão de aminoácidos que servirá como referência, é efetuada a identificação de cada um dos aminoácidos baseada no tempo de retenção de cada um e na área do pico obtida na amostra comparando-se com o padrão utilizado.

A fórmula geral para o cálculo é:

$$\frac{\text{Área do aminoácido na amostra}}{\text{Área do aminoácido no padrão}} \times \frac{\text{Concentração do aminoácido no padrão}}{\text{Concentração do aminoácido na amostra}} =$$

Em alguns casos, o equipamento de HPLC já dispõe de sistemas de integração capazes de utilizar a área relativa ao padrão e sua correspondente concentração convertendo a área da amostra em um valor de concentração. É importante ressaltar que macromoléculas que contêm concentrações predominantes de algum(ns) aminoácido(s) devem ser analisadas em duas etapas. A primeira visa à determinação dos aminoácidos de con-

Tabela 29.2 – Descrição dos solventes e programas de gradiente no HPLC utilizados em quatro sistemas de fase reversa para a separação de PTC-aminoácidos.

Sistema	Solvente B	Tempo (min)	Programa analítico		
			%A	%B	%C
I	0,1 M de acetato de amônio	0	100	0	0
	pH 6,8 em 50% (v/v)	15	85	15	0
	Acetonitrila: água	30	50	50	0
		30,1	0	0	100
		40	100	0	0
II	0,1 M de acetato de amônio	0	100	0	
	pH 6,8, em metanol	12	80	20	
	água (80:20) v/v	13	65	35	
		30	60	40	
		32	0	100	
		35	0	100	
		38	100	0	
		50	100	0	
III	0,1 M acetato de amônio	0	100	0	
	pH 6,8, em acetonitrila	15	85	15	
	Metanol: água	30	50	50	
	(44:10:46)	34	0	100	
		37	0	100	
		40	100	0	
		50	100	0	
IV	O mesmo que I	0	100	0	0
		30	50	50	0
		30,1	0	0	100
		40	100	0	

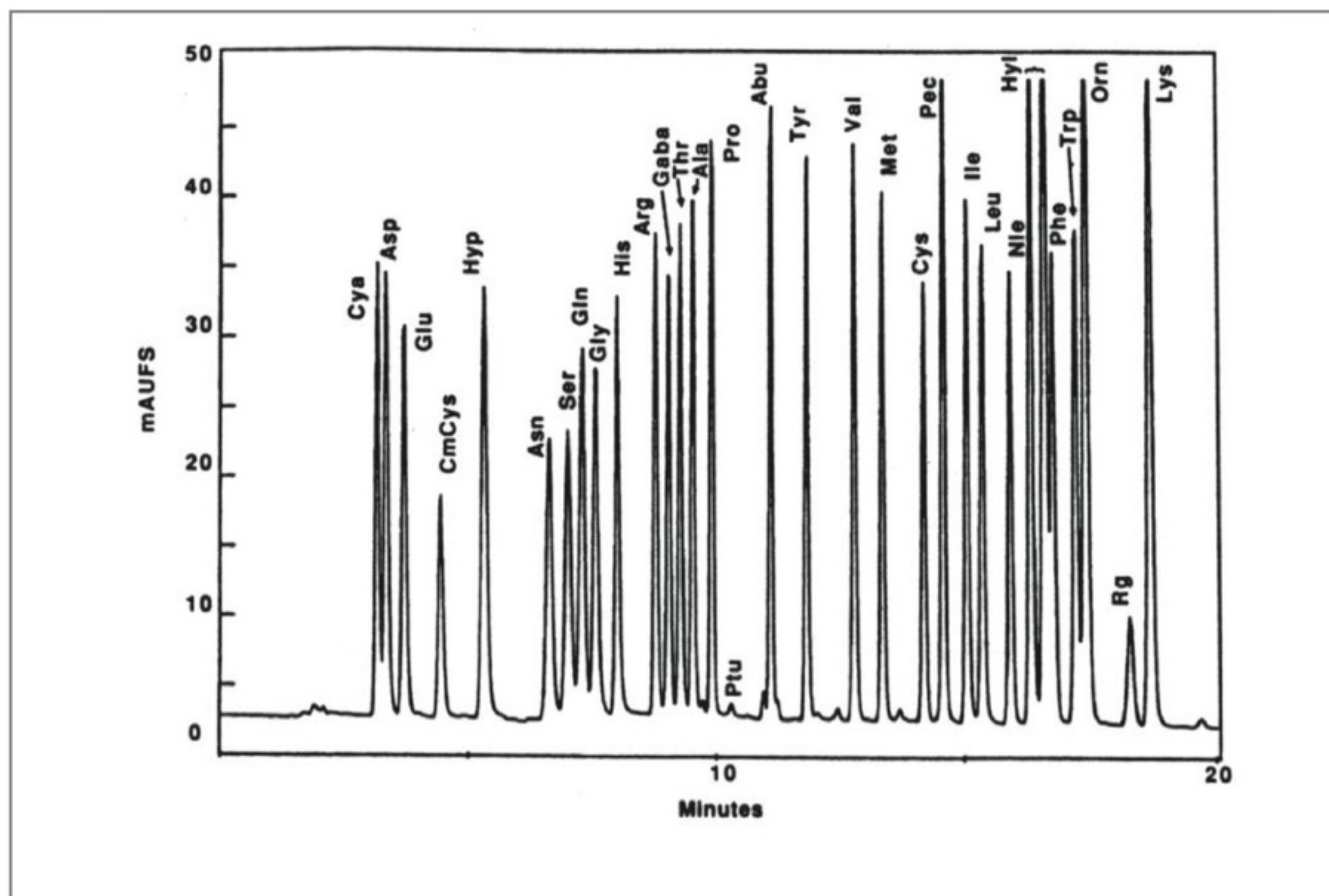


Figura 29.3 – Registro cromatográfico típico de um padrão para análise de aminoácidos derivatizado por fenilisotiocianato (retirado de Cohen e Strydom, 1988). MAUFS – Unidades de Fundo de Escala Medida em Miliampére; Cys – cisteína; Asp – ácido aspártico; Glu – ácido glutâmico; CmCys – Carboximetil cisteína; Hyp – ácido hipúrico.

teúdo minoritário e a outra analisa aqueles que se encontram em número muito superior aos outros. Dessa forma, é possível efetuar a identificação utilizando-se maior sensibilidade do aparelho para o primeiro caso e efetuando-se diluições no segundo, para se obter uma concentração do(s) aminoácido(s) majoritário(s) dentro de uma faixa linear de concentração.

Métodos Analíticos para Determinação de Aminoácidos com Alta Sensibilidade

Recentemente, é possível, por meio da utilização de detectores que utilizam outros princípios na detecção, efetuar a identificação e a quantificação de aminoácidos em concentrações inferiores a pmol e, em alguns casos até inferior a fmol. Logicamente, estes equipamentos são muito mais onerosos e a técnica para a obtenção dos resultados é mais refinada e em alguns casos mais demorada. Entretanto, em muitos casos nos quais há necessidade de uma determinação muito acurada e o custo for justificável, com certeza estas

aplicações podem ser consideradas. Entre os principais métodos podemos citar a quantificação por detecção eletroquímica em que o material é também separado por cromatografia líquida em fase reversa e determinado de acordo com seu potencial elétrico diante uma célula coulométrica de detecção através de um eletrodo de platina ou ouro. A passagem do aminoácido gera uma diferença de potencial elétrico no eletrodo proporcional a sua quantidade. Outro método ainda mais sensível mas não tão frequentemente empregado em rotinas de análise, a não ser em casos muito particulares em função do elevado preço do equipamento, é o da cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas. Neste caso, o aminoácido é detectado em função de seu peso molecular por meio da utilização de programas de computador acoplados ao equipamento, sendo possível determinar sua quantidade baseada na abundância de determinada massa diante de um padrão. Esta metodologia permite a quantificação também de misturas de aminoácidos sem a utilização do equipamento de cromatografia líquida.

Tabela 29.3 – Tempos de retenção (R_t) relativos para PTC-derivativos de vários aminoácidos.

Composto	R_t	Composto	R_t
Ácido cisteico	0,18	Treonina	0,56
Fosfoserina	0,19	Alanina	0,57
Ácido aspártico	0,19	Prolina	0,59
Ácido glutâmico	0,21	Amônia	0,61
Fosfotreonina	0,22	Metionina sulfona	0,63
S-Sulfocisteína	0,22	Tirosina-O-sulfato	0,63
Carboximetil cisteína	0,25	Ácido α -Amino butirico	0,67
Fosfotirosina	0,28	Tirosina	0,73
Hidroxiprolina	0,28	Valina	0,77
Galactosamina	0,38	Metionina	0,81
Asparagina	0,38	Cistina-1	0,84
Glucosamina	0,40	Homoserino lactona	0,86
Serina	0,40	Cistina-2	0,87
Glutamina	0,43	Isoleucina	0,90
Glicina	0,44	Leucina	0,91
β -Alanina	0,48	Nitrotirosina	0,94
Sulfopropil cisteína	0,48	Norleucina	0,94
Homosserina	0,48	Fenilalanina	1,00
Histidina	0,50	Triptofano	1,03
Citrulina	0,52	Ornitina	1,03
Arginina	0,54	Reagente	1,05
Metionina sulfóxido	0,54	Lisina	1,10
Metionina sulfóxido	0,55	Dimetil/lisina	1,17
N,N-Dimetillisina	0,55		

Considerações Finais

A análise de aminoácidos tem sido de grande utilidade como metodologia analítica quantitativa em diversos setores, não só da pesquisa, como também da análise de alimentos, análises clínicas etc. Seu valor é indiscutível; entretanto, é importante ressaltar que este capítulo tem procurado propiciar uma visão ampla da metodologia. Quando esta for aplicada, é fundamental que se observe alguns cuidados:

- Qual o material que será analisado e qual sua característica, por exemplo, peso molecular da amostra, predominância de algum aminoácido em particular etc.
- Se a amostra tem contaminantes que podem interferir e qual a importância destes contaminantes na determinação. Muitas vezes, há sobreposição do pico contaminante com o de um aminoácido que está sendo determinado, levando a uma quantificação superestimada deste aminoácido.

- Se existem aminoácidos atípicos na constituição da amostra, se a resposta for positiva é importante que o padrão de aminoácidos também contenha estes aminoácidos em sua composição.
- Se a análise for efetuada após a hidrólise, é importante monitorar e analisar o material em diferentes tempos de hidrólise e o resultado aferido será uma média dos tempos de hidrólise.

Outro aspecto fundamental neste caso é que os aminoácidos Asp, Asn e Glu, Gln após a hidrólise são obtidos na forma Asx e Glx, isto é, não é possível de se diferenciar um aminoácido de outro.

Feito isso, é possível obter uma análise reprodutiva e confiável e com excelente sensibilidade aliada a um custo relativamente baixo.

Referências

- Chiou, S.H.; Wang, K.T. A rapid and novel means of protein hydrolysis by microwave irradiation using teflon-pyrex tubes In: Joseph, J. *Current Research in Protein Chemistry: Techniques, Structure, and Function*. Villafranca: Academic Press, 1990. pp. 3-10.
- Cohen, S.A.; Strydom, D.J. Amino acid analysis utilizing phenylisothiocyanate derivatives. *Anal. Biochem.* 174(1):1-16, 1988.
- Donzanti, B.A.; Yamamoto, B.K. An improved and rapid HPLC-EC method for the isocratic separation of amino acid neurotransmitters from brain tissue and microdialysis perfusates. *Life Scie.* 43(11):913-922, 1988.
- Ebert, R.F. Amino acid analysis by HPLC: optimized conditions for chromatography of phenylthiocarbamyl derivatives. *Anal. Biochem.*, 154(2):431-435, 1986.
- Graser, T.A.; Godel, H.G.; Albers, S.; Földi, P.; Furst, P. An ultra rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for determination of tissue and plasma free amino acids. *Anal. Biochem.*, 151(1):142-152, 1985
- Liu, T.Y.; Chang, Y.H. Hydrolysis of protein with p-toluenesulfonic acid determination of tryptophan. *J. Biol. Chem.* 246(9):2842-2848, 1971.
- Matsudaira, P.T. *A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing*. Whitehead Institute for Biomedical Research and Department of Biology, Academic Press, 1989. pp. 3-13.

30. Detecção de Proteínas Glicosiladas

Claudio Miguel da Costa Neto

Este capítulo apresenta o tópico glicosilação de proteínas de forma sucinta, introduzindo aspectos teóricos fundamentais tanto para a compreensão geral do assunto como para a correta utilização de metodologias disponíveis para a investigação de glicoproteínas e outros glicoconjugados. Alguns aspectos metodológicos e práticos são ainda cobertos neste capítulo, tratando de diferentes abordagens para análise de glicoproteínas e de problemas frequentemente encontrados no desenvolvimento das metodologias empregadas. Há descrição de experimentos clássicos referentes à glicosilação de proteínas e de outros realizados rotineiramente em laboratórios de Bioquímica e de Biologia Molecular, ilustrados por meio de resultados obtidos em experimentos de nosso laboratório. Considerando-se a importância de alguns *kits* disponíveis comercialmente para a caracterização estrutural de glicoconjugados, eles também foram incluídos neste capítulo; estes *kits* baseiam-se no uso racional de diferentes glicosidases e outras proteínas cujas especificidades de ação auxiliam na definição molecular dos glicoconjugados. O apêndice 2, ao final do capítulo, inclui alguns endereços de *homepages* que oferecem informações atualizadas sobre reagentes, equipamentos e metodologias para análise de glicoconjugados.

Introdução

Glicoproteínas são proteínas que contêm carboidratos ligados covalentemente em diferentes quantidades, como cadeias grandes ou pequenas, ramificadas ou não. As glicoproteínas podem existir tanto na forma solúvel quanto associadas a membranas, podendo ser subdivididas em três classes principais: (1) proteínas que possuem uma ligação O-glicosídica, com a participação da hidroxila de um resíduo de serina ou de treonina (Fig. 30.1); (2) proteínas que possuem uma ligação N-glicosídica, com a participação do nitrogênio da cadeia lateral de uma asparagina (Fig. 30.1); (3) proteínas que possuem

ligados ao aminoácido carboxila terminal, através de uma fosforiletanolamina, um complexo grupo incluindo carboidratos e fosfatidilinosóis. Esta última classe frequentemente corresponde a glicoproteínas ancoradas à membrana por GPI (glicosilfosfatidilinositol). Em algumas glicoproteínas são encontradas mais de um tipo de ligação glicosídica (Fig. 30.2). Alguns dos papéis funcionais descritos para diferentes glicoproteínas são: ação como hormônios, enzimas, lubrificantes, moléculas de reconhecimento e transportadores. Em humanos, grande parte das proteínas plasmáticas e de membrana é glicosilada, em que a presença do grupo carboidrato (que pode variar de 1% a 80%) possui um relevante papel funcional na fisiopatologia do organismo. Entre os possíveis efeitos nas proteínas nas quais os carboidratos estão ligados podemos citar a alteração da solubilidade, da estabilidade, da velocidade de degradação (meia-vida), do tráfego subcelular e até mesmo dos mecanismos envolvidos em enovelamento e formação de estrutura terciária. Com base nestas informações, a ligação de um açúcar a uma proteína passa a ser de grande importância para pesquisadores de diversas áreas.

Existe uma grande variedade de estruturas oligossacarídeas que podem ser formadas a partir de poucos monossacarídeos. Esta variedade estrutural dos oligossacarídeos presentes em uma glicoproteína colabora para a seletividade em uma série de eventos bioquímicos, que incluem desde especificidade enzimática, interação com receptores, e até o reconhecimento por outras proteínas transportadoras. Em alguns casos, uma mesma proteína, produzida em diferentes tecidos, pode apresentar um padrão diferenciado e específico de glicosilação, o que chamamos de glicoformas. A compreensão bioquímica e estrutural das glicoformas faz destas moléculas importantes marcadores moleculares específicos para um dado tecido, linhagem celular ou mesmo para um evento fisiopatológico.

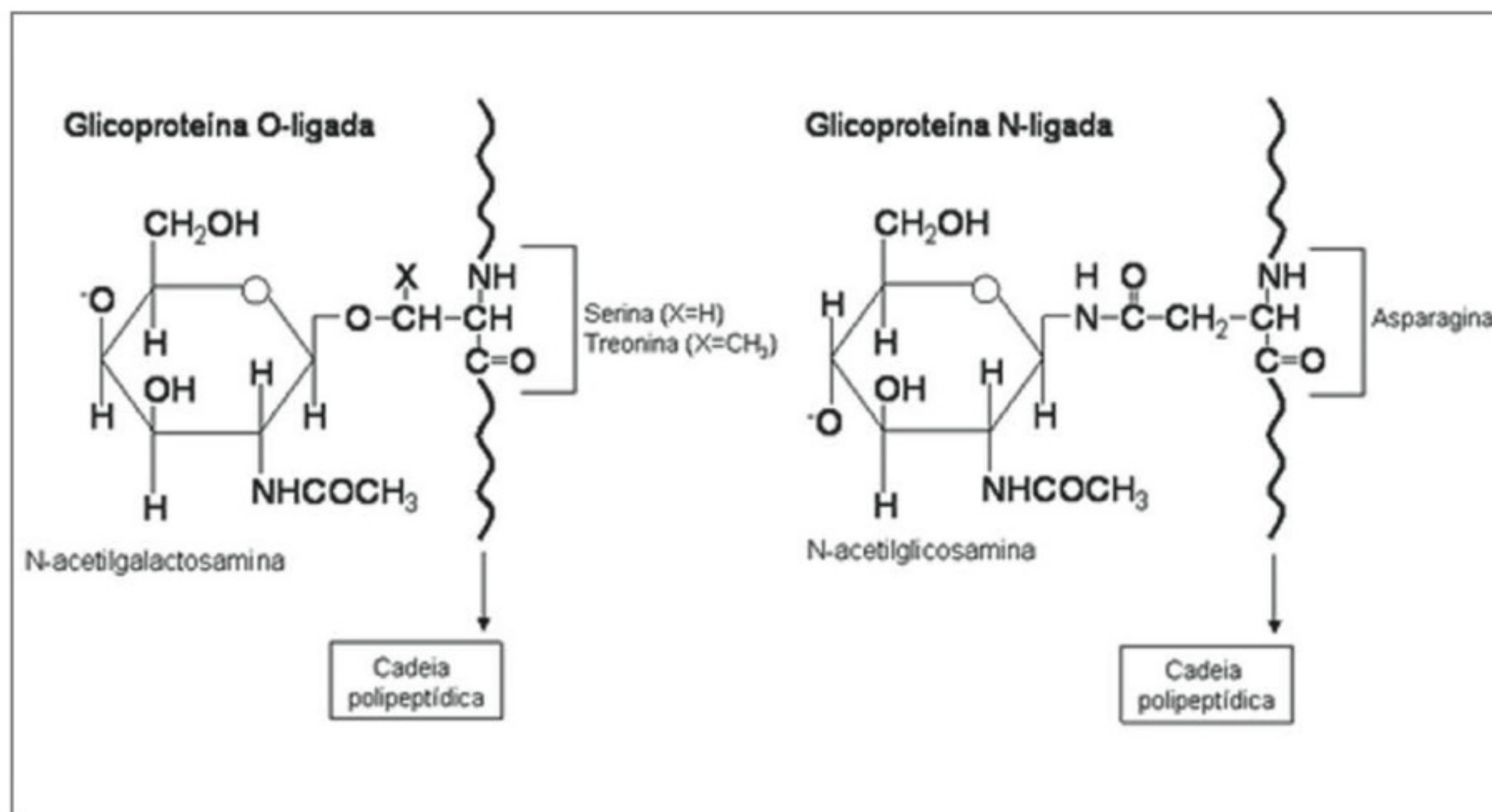


Figura 30.1 – As ligações do tipo O- e N- em glicoproteínas.

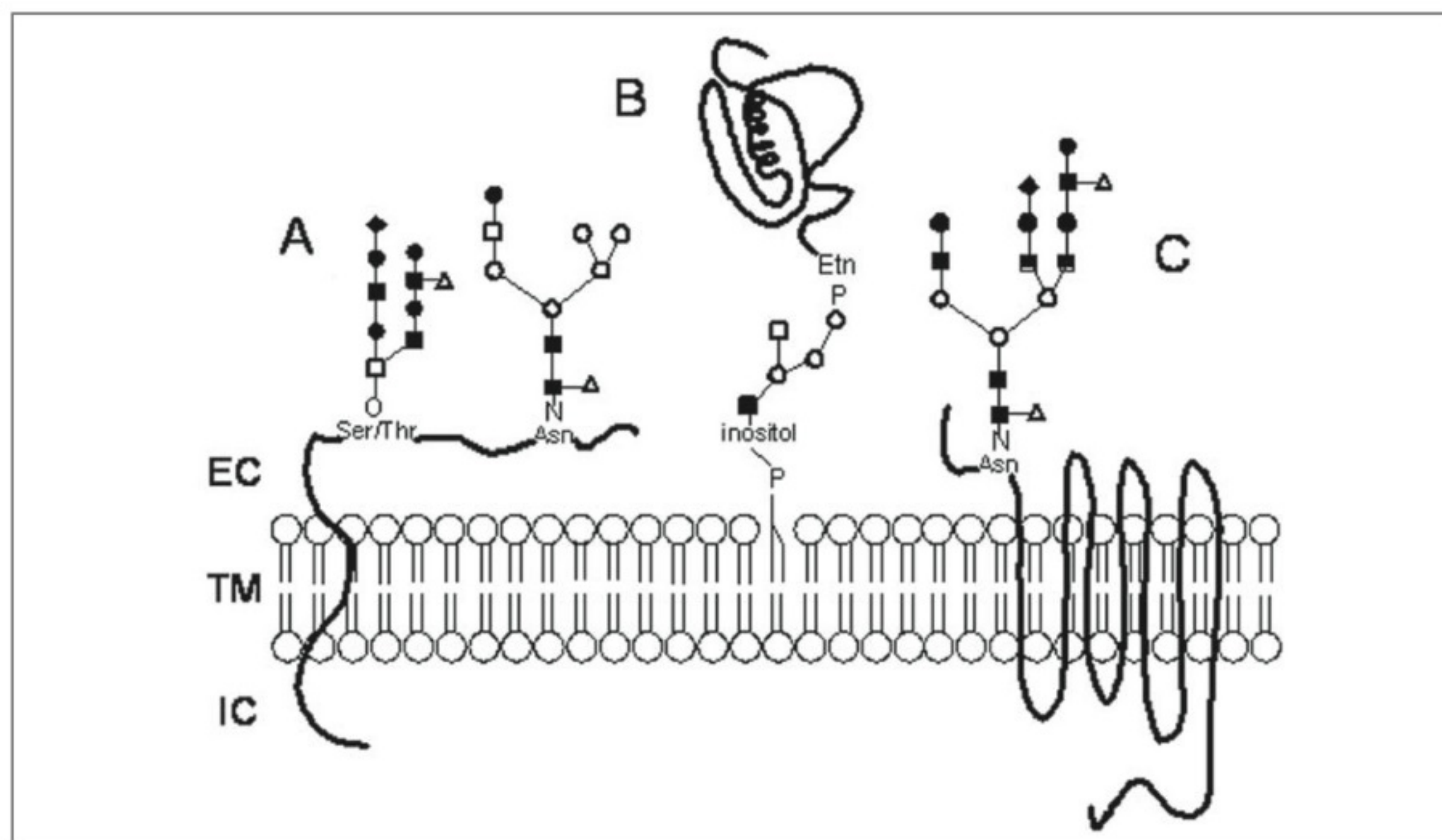


Figura 30.2 – Esquema ilustrativo representando as três principais formas em que as proteínas podem ser glicosiladas. (A) Uma proteína de membrana possuindo ligação O-glicosídica em serina ou treonina (Ser/Thr) e ligação N-glicosídica em asparagina (Asn); (B) uma proteína ancorada à membrana através de uma âncora GPI; (C) um receptor acoplado à proteína G possuindo uma ligação N-glicosídica em resíduo de Asn. Legenda do esquema: EC = extracelular, TM = transmembrana, IC = intracelular, ● = galactose, ○ = manose, ■ = N-acetilglicosamina, □ = N-acetilgalactosamina, Δ = fucose, ◆ = ácido siálico.

Os carboidratos não acompanharam os ácidos nucleicos e proteínas na revolução molecular que tem ocorrido nos últimos anos, em grande parte, por razões metodológicas. Carboidratos possuem cadeias complexas e ramificadas, o que dificulta sua análise. Por outro lado, ácidos nucleicos e proteínas são cadeias poliméricas lineares. Porém, muitos avanços tecnológicos foram alcançados recentemente, o que tem permitido a análise do papel estrutural e funcional de carboidratos com mais profundidade. Como exemplo, atualmente já está disponível uma série de enzimas glicosidases recombinantes purificadas, com alto grau de especificidade. Além disso, está disponível no mercado um número razoável de *kits* que permitem a análise de glicoproteínas, mesmo em laboratórios sem tradição no estudo.

Metodologias para Detecção, Purificação e Análise de Glicoproteínas

Os protocolos apresentados neste capítulo permitem uma introdução prática ao assunto e, eventualmente, à obtenção de análises biológicas satisfatórias. Porém, deve-se ressaltar que não são técnicas suficientes para permitir análises mais refinadas, como o aspecto estrutural de um dado oligossacarídeo. O uso de glicosidases recombinantes, com alto grau de especificidade, tem contribuído grandemente para estes tipos de estudos.

Embora alguma informação sempre possa ser obtida a partir de um extrato biológico complexo, a melhor alternativa é sempre a purificação. Podem ser utilizadas as metodologias clássicas de purificação para proteínas não glicosiladas. Por outro lado, glicoproteínas normalmente possuem açúcares que são reconhecidos por lectinas (proteínas com afinidade por carboidratos) de plantas. Logo, o uso de cromatografias de afinidade, usando lectinas imobilizadas em uma matriz (protocolos 1 e 2), como passo único ou na fase final de purificação, passa a ser uma importante ferramenta. Outra possibilidade de análise para algumas proteínas glicosiladas, especialmente para proteínas de membrana com complexa estruturação tridimensional, é a realização de experimentos diretamente em células inteiras.

Devido à grande complexidade e variedade de açúcares que podem estar presentes nas glicoproteínas, não existe um procedimento que possa ser descrito como padrão para sua purificação. Por isso, a obtenção prévia de algumas informações sobre a glicoproteína de interesse é de grande importância para a definição das estratégias a serem utilizadas.

A seguir são apresentados alguns tipos de glicoproteínas, bem como algumas características, possíveis procedimentos e problemas usualmente encontrados.

Proteínas Secretadas

Pode-se determinar se uma determinada proteína é secretada pelo meio de cultura usado no cultivo das células que a produziram. Caso a linhagem celular utilizada necessite de adição de soro ao meio de cultura, este pode ser um fator complicador, devido à grande quantidade de glicoproteínas presentes neste.

Proteínas Não Secretadas

Caso a proteína de interesse não seja secretada, podem-se romper as células em meio iso-osmótico (por exemplo, sacarose) seguido de centrifugação para se separar membranas e vesículas da fração solúvel. É importante saber que, normalmente, glicoproteínas não são encontradas na fração solúvel, embora recentemente alguns casos tenham sido descritos.

Proteínas de Organelas

Caso a proteína de interesse também não tenha sido detectada na fração solúvel, a fração de membranas e vesículas deve ser submetida a um procedimento para rompimento (por exemplo, congelamento ou meio hiposmótico). Após este procedimento, as membranas são novamente precipitadas por centrifugação. Durante este procedimento, é importante o uso de inibidores de proteases, uma vez que as enzimas lisossomais também serão liberadas.

Proteínas de Membrana ou Ancoradas a esta por meio de Glicofosfolipídios

Caso a proteína de interesse não tenha sido detectada em nenhum dos procedimentos descritos acima, provavelmente deve ser uma proteína de membrana ou deve estar ancorada à membrana por meio de um glicofosfolipídio. Detergentes não iônicos podem ser utilizados em concentrações crescentes como tentativa para se solubilizar estas proteínas. Detergentes com alta concentração crítica micelar (CMC) e que possam ser facilmente removidos posteriormente através de diálise são preferidos (por exemplo, hexil, heptil e octil-glicosídeos). Entretanto, estes detergentes contendo glicose, se não devidamente retirados por diálise, podem interferir na interação de algumas glicoproteínas em colunas de afinidade com lectinas (por exemplo, concanavalina

A-Sepharose [Con A-Sepharose]), ou mesmo interferir na análise direta do conteúdo de açúcares de uma dada amostra.

Caso a proteína seja ancorada por glicofosfolípidios (ver exemplo B da Fig. 2), o componente lipídico pode causar sua solubilização em frações aquosas contendo alguns tipos de detergentes (por exemplo, Triton X-114), assim como facilitar a sua interação em matrizes hidrofóbicas (por exemplo, fenil-Sepharose). Em alguns casos, a porção lipídica da âncora pode ser removida por meio do tratamento com a enzima fosfolipase C. Esta digestão deixa a porção do carboidrato da âncora associada à proteína, o que a torna mais solúvel e, conseqüentemente, com menor afinidade pelas matrizes cromatográficas de caráter hidrofóbico.

Outra possibilidade de análise de proteínas de membrana é sua utilização em células inteiras. Este procedimento é frequentemente realizado no caso de receptores acoplados à proteína G. Estes receptores possuem sete α -hélices que atravessam a membrana plasmática e com frequência alguns sítios de glicosilação são encontrados na região extracelular (ver exemplo C da Fig. 30.2). Devido à sua estrutura complexa e à dificuldade de solubilização e/ou reconstituição estrutural, receptores desta superfamília são frequentemente analisados em células inteiras. Para isso, o cDNA correspondente à proteína de interesse deve ser transfectado em uma linhagem celular que sabidamente não possui receptores endógenos correspondentes àqueles que serão analisados (protocolo 3).

Purificação de Glicoproteínas

Alguns dos métodos clássicos utilizados para a purificação de proteínas (visite a *homepage* da seção *Health Care* da General Ectrics – Apêndice 2), tais como cromatografias de exclusão molecular e de troca iônica, além de eletroforese, podem ser usados para a purificação de glicoproteínas. As lectinas, proteínas que ligam açúcares, também podem ser utilizadas para a purificação de glicoproteínas. Como exemplo, em uma cromatografia de afinidade, uma lectina é ligada covalentemente à uma matriz para cromatografia, a qual é utilizada para a purificação seletiva de glicoproteínas com afinidade pela lectina utilizada (protocolos 1 e 2). Diferentes lectinas interagem seletivamente com vários açúcares. Um fator de complicação comum na purificação de glicoproteínas é o fato de que frequentemente estas sejam encontradas como diferentes glicoformas, isto é, possuindo a mesma sequência de aminoácidos, porém com grande variação no seu conteúdo carboidrato.

Purificação por Exclusão Molecular (Gel-Filtração) e SDS-PAGE

Proteínas com alto conteúdo de carboidratos eluem mais rapidamente do que as não glicosiladas com mesmo tamanho durante cromatografia de exclusão molecular. Caso a quantidade de carboidratos seja variável, pode acarretar o alargamento do pico correspondente no cromatograma.

A migração de proteínas em SDS-PAGE também é afetada pelo grau de glicosilação. Uma mesma proteína, contendo cadeias variáveis de carboidratos, pode ser observada no gel como uma banda larga ou mesmo como um rastro. O tratamento com glicosidases pode ser usado para uma caracterização mais precisa de uma amostra (visite as *homepages* das empresas Glyko, Pierce e Markergene – Apêndice 2). É importante lembrar que glicoproteínas contendo alta carga aniônica não são adequadamente coradas com Coomassie ou mesmo com prata. Recentemente, o uso de fluoróforos (por exemplo, reagente de fluorescência 1,5-EDANS) tem permitido a marcação e maior facilidade em diferentes tipos de análises de glicoproteínas.

Purificação por Troca Iônica

A presença de ácido siálico e de ésteres de sulfato pode facilitar a ligação de algumas glicoproteínas em matrizes cromatográficas para troca aniônica (por exemplo, DEAE). A eluição é realizada com soluções contendo alta concentração de sal. As glicoproteínas devem ser eluídas mais tardiamente, que as proteínas não glicosiladas.

Cromatografia de Afinidade por Lectina

O procedimento mais usado para a purificação específica de uma glicoproteína, direta ou apenas na fase final, é o uso de lectinas (protocolos 1 e 2). Já foram isoladas várias lectinas de plantas, e para algumas delas a especificidade para alguns açúcares já é conhecida.

Uma vez que as glicoproteínas normalmente possuem várias cadeias de um certo tipo de açúcar, pode acarretar uma interação múltipla com as lectinas na resina, tornando, por sua vez, difícil a eluição destas proteínas para fora da coluna. Concanavalina A-Sepharose (Con A-Sepharose) é a matriz com lectina mais utilizada para a purificação de glicoproteínas devido a seu relativo baixo custo, estabilidade e sua capacidade de interagir com diferentes tipos de carboidratos. As proteínas ligadas nesta matriz podem ser eluídas com α -metil-D-manosídio (α MM).

Contaminação com Carboidratos

Mesmo a observação de uma banda bem definida em uma análise por SDS-PAGE pode estar inadequada para análise de carboidratos. A glicose é raramente encontrada em cadeias de açúcares em proteínas e, por outro lado, é o contaminante mais frequente. Isto porque vários materiais usados no dia-a-dia em um laboratório podem contribuir com uma fonte de açúcar. Entre os materiais mais comuns podemos citar: DEAE e CM-celulose, agarose, Sephadex, sacarose, glicerol e detergentes contendo glicosídeos. É importante lembrar que se a amostra proteica foi purificada por gradiente de sacarose, por extração com detergentes contendo glicosídeos ou mesmo estocados em glicerol, a amostra precisa passar por um processo intenso de diálise para que o conteúdo carboidrato possa ser analisado. Dessa maneira, para a realização de cromatografia de exclusão molecular, é preferível a utilização de géis com base em acrilamida do que aqueles contendo dextrana. Mesmo com todas essas precauções, se glicose for detectada na análise de carboidratos é mais provável que seja um contaminante do que um componente de uma glicoproteína.

Protocolos Experimentais

Este item tem como objetivo descrever alguns protocolos utilizados no estudo de glicoproteínas. Os protocolos descritos são bastante diversos no seu objetivo bem como na estrutura laboratorial necessária para sua realização. Alguns destes protocolos estão relacionados à purificação de glicoproteínas, enquanto outros estão relacionados ao estudo de estrutura e função destas proteínas diretamente em células inteiras, nas quais estas estão sendo produzidas.

Protocolo 1

Estudo piloto para determinar interações com lectinas e condições de eluição.

1. Preparar uma suspensão de Con A-Sepharose a 50% no tampão de sua escolha para a cromatografia. Utilizar um pipetador automático com uma ponteira com a ponta cortada para aliquotar 200 μ L da suspensão em 7 tubos de microcentrífuga. Tomar cuidado para que a suspensão esteja homogênea quando for pipetar.
2. Adicionar 50 μ L da amostra de proteína em cada tubo e incubar por 15 minutos, agitando ocasionalmente. Centrifugar os tubos por 1 minuto a 1.000 $\times g$ para sedimentação. Separar o sobrenadante para análise no passo 5.

3. Lavar o precipitado três vezes com 1,5 mL do tampão em uso. Após cada lavagem, centrifugar novamente e descartar o sobrenadante, como descrito no passo 2.
4. Ressuspender o precipitado de cada um dos tubos em 200 μ L de α MM nas seguintes concentrações: 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,0 e 1,5 M.
5. Incubar por 15 minutos e centrifugar como descrito no passo 2. Analisar os sobrenadantes, inclusive aquele coletado no passo 2, com um ensaio para a detecção de proteína. Dessa forma, será possível descobrir qual a concentração de α MM utilizada que possibilitou a melhor eluição das glicoproteínas que interagiram com a Con A-Sepharose.

Obs.: Caso não ocorra eluição de proteínas em nenhuma destas condições, pode-se aumentar a temperatura ou o tempo de incubação por até várias horas.

Protocolo 2

Cromatografia de afinidade utilizando Con A-Sepharose.

Material

- Con A-Sepharose 10 mg/mL.
- α MM 0,5 M dissolvido no tampão para a cromatografia de sua escolha.
- Amostra da proteína dissolvida no mesmo tampão.
- Lã de vidro.
- Coluna para cromatografia de 1,5 \times 30 cm.

Obs.: Caso a proteína de interesse seja estável, este procedimento pode ser desenvolvido em temperatura ambiente. Caso contrário, o procedimento deve ser realizado em uma câmara fria e os reagentes devem ser pré-resfriados em banho de gelo.

Procedimento

1. Misturar a Con A-Sepharose 10 mg/mL em 50 mL de tampão e ressuspender gentilmente. Retirar o gás da mistura.
2. Colocar um chumaço de lã de vidro no fundo da coluna e despejar a mistura dentro desta.
3. Continuar a colocar a mistura dentro da coluna até atingir cerca de 28 cm, o que corresponde a aproximadamente 50 mL. Lavar com 3 volumes de tampão (usar como referência o volume de resina utilizado na coluna) para retirar as Con A que se encontram fracamente ligadas ou degradadas.

4. Lavar com 3 volumes de α MM 0,5 M, ou a concentração mais alta que for utilizar.
5. Lavar com pelo menos 5 volumes de tampão sem α MM, para reequilibrar a coluna.
6. Gentilmente adicionar a amostra de proteína no topo da coluna.
7. Lavar a coluna com cerca de 10 volumes de tampão e monitorar as amostras coletadas por absorbância a 280 nm, até que a linha de base seja restabelecida.
8. Analisar a possível presença da proteína de interesse nas amostras coletadas durante a lavagem.
9. Eluir as proteínas ligadas na coluna com α MM 0,5M e monitore as amostras coletadas por absorbância a 280 nm e por ensaios de atividade específicos. Reuna em um único tubo as frações contendo a atividade.
10. Regenerar a coluna passando 10 volumes de tampão. Guardar a coluna a 4°C em tampão contendo 0,02% de NaN_3 . Sempre reequilibrar a coluna antes de usá-la novamente.

Protocolo 3

Ensaio de interação (*binding*) para agonistas e antagonistas a receptores acoplados à proteína G (GPCRs) em células inteiras.

Os ensaios de *binding* deverão ser realizados a 4°C com células inteiras, 48 horas após a transfecção. Veja o apêndice 1 para procedimentos de cultura e transfecção de células COS-7 e CHO.

1. Vinte quatro horas após a transfecção transferir as células transfectadas para placas de 6, 12 ou 24 poços. Tratar as placas previamente com solução de polilisina (0,1 mg/mL), enxaguar com PBS imediatamente antes de se colocar as células.
2. Após colocar as células, incubar as placas na estufa até o dia seguinte.
3. Imediatamente antes de ser iniciado o ensaio de *binding*, enxaguar as células brevemente com tampão de lavagem (Tris-HCl 25 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, MgCl_2 5 mM, albumina de soro bovino).
4. Adicionar 500 μL de tampão de reação (Tris-HCl 25 mM, pH 7,4, MgCl_2 5 mM, albumina de soro bovino a 0,1%, bacitracina 100 $\mu\text{g/mL}$) contendo o ligante radioativo de interesse.

5. Adicionar diferentes concentrações de ligantes frios, em um volume final de reação de 525 μL , em tampão de reação e incubar por 24 horas a 4°C.
6. Após 24 horas, lavar os poços duas vezes com o mesmo tampão (sem bacitracina).
7. Adicionar a cada poço 1 mL de tampão de lise (ureia 48%, detergente Nonidet P-40 a 2%, preparados em ácido acético 3 M).
8. Proceder a contagem radioativa.

Outros Protocolos

Existe uma série de protocolos simples que podem ser realizados com o uso de *kits* e, logo, dispensam a necessidade de estruturação laboratorial para serem realizados. Entre várias aplicações, alguns destes *kits* permitem saber de maneira rápida se uma dada proteína é glicosilada ou não, analisar o possível papel biológico da porção carboidrato, retirada da porção carboidrato para estudos estruturais em proteínas, sequenciamento do componente oligossacarídeo entre outras. Também estão disponíveis no mercado uma série de glicosidases com reconhecimento específico para diferentes açúcares substratos. Após o tratamento com estas glicosidases, a retirada dos açúcares pode ser monitorada por HPLC ou por eletroforese, a qual é bastante facilitada quando utilizada a técnica de marcação por fluoróforos. Veja o apêndice 2 para as *homepages* das empresas Glyko, Pierce e Markergene, responsáveis, entre outras, pela comercialização de tais reagentes.

Apêndice 1 – Cultura e Transfecção de Células de Mamíferos em Cultura de Células

Células COS-7 ou células CHO devem ser cultivadas em garrafas de cultura contendo meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com soro fetal bovino a 10% e glutamina 2 mM. Gentamicina (0,01 mg/mL) ou penicilina e estreptomicina (100 U/mL e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) devem ser utilizadas como antibiótico. As células devem ser mantidas em estufa a 37°C, com 10% de CO_2 e 90% de ar.

Podem-se usar vários métodos para transfecção, o de menor custo é o de precipitação por fosfato de cálcio,

descrito para a transfecção transiente em células COS-7. Outro método de transfecção, de alta eficiência, é por meio do uso de lipofectamina ou reagentes com o mesmo princípio, descrito para a transfecção permanente em células CHO.

Transfecção Transiente em Células COS-7

Materiais

- Tampão TE: Tris HCl 10mM, EDTA 1 mM, pH 8,0.
- Tampão PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 4,3 mM, KH_2PO_4 1,4 mM, pH 7,5.
- Tampão 2 × HBS: NaCl 280mM, HEPES 50 mM, Na_2HPO_4 1,5 mM, pH 7,2.
- CaCl_2 2 M.
- Cloroquina 2 mg/mL.

Procedimento

1. Aproximadamente 24 horas antes da transfecção remover as células das garrafas por meio de incubação por 10 minutos com PBS contendo EDTA 10 mM. Contar e transferir as células para outras garrafas de cultura (por exemplo, para uma garrafa de 800 mL devem ser adicionadas 6×10^6 células em 10 mL de meio DMEM).
2. Aproximadamente 2 horas antes da transfecção, trocar o meio de cultura das células, mantendo o mesmo volume.
3. Em um tubo de plástico misturar 30 µg do DNA de interesse, 60 µL de CaCl_2 2 M e TE para atingir o volume final de 480 µL. Em um segundo tubo, adicionar 480 µL de 2 × HBS.
4. Adicionar gota a gota a mistura contendo o DNA no tubo contendo 2 × HBS, mantendo sob leve agitação.
5. Incubar à temperatura ambiente por 45 minutos.
6. Transferir o conteúdo do tubo delicadamente para a garrafa de cultura contendo as células e adicionar 300 µL de cloroquina 2 mg/mL.
7. Incubar as células por 5 horas a 37°C, com 10% de CO_2 e 90% de ar.
8. Aspirar o meio de cultura, lave com 10 mL de PBS e adicione 20 mL de meio de cultura.

Transfecção Permanente em Células CHO

Materiais

- Reagente para transfecção lipofectina (Invitrogen) ou similar.
- Tampão TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0.
- Tampão PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 4,3 mM, KH_2PO_4 1,4 mM, pH 7,5.

Procedimento

1. Aproximadamente 24 horas antes da transfecção remover as células das garrafas por meio de incubação por 10 minutos com PBS contendo EDTA 10 mM. Contar e transferir as células para a placa de Petri de 35 mm, na quantidade de 3×10^5 células por placa, em 2 mL de meio DMEM suplementado.
2. Em um tubo plástico misturar 10 µg do DNA de interesse a 250 µL de DMEM não suplementado.
3. Em outro tubo de plástico misturar 10 µL de lipofectina a 250 µL de DMEM não suplementado.
4. Homogeneizar individualmente cada um dos tubos e incubar à temperatura ambiente por 45 minutos.
5. Gota a gota misturar os conteúdos dos dois tubos gentilmente e incubar novamente por 10 minutos.
6. Adicionar 2 mL de DMEM não suplementado ao tubo contendo a mistura de DNA e lipofectina.
7. Aspirar o meio de cultura da placa das células, lavar com 2 mL de PBS e substituir pelo meio contendo a mistura de DNA e lipofectina.
8. Incubar as placas por 5 horas a 37°C, com 10% de CO_2 e 90% de ar.
9. Aspirar o meio de cultura, lavar com 2 mL de PBS e adicione 5 mL de meio de cultura suplementado, contendo 500 µg/mL de geneticina (G418), para a seleção dos clones de interesse, ou seja, aqueles contendo o plasmídeo inserido.

Apêndice 2 – Homepages de Algumas Empresas

<http://www.prozyme.com/glyko/>

Homepage da Glyko, empresa com bastante tradição em reagentes, enzimas e metodologias para o estudo de carboidratos e glicoconjugados.

<http://www.gehealthcare.com/>

Homepage da seção *Health Care* da General Electrics, que mais recentemente englobou a Amersham, que anteriormente havia englobado a Pharmacia, empresa que originalmente desenvolveu a Sepharose e diversas outras matrizes para cromatografia.

<http://www.piercenet.com/>

Homepage da Pierce, empresa tradicional na comercialização de diversos reagentes e *kits*, incluindo alguns para a detecção e análise de carboidratos de glicoproteínas.

<http://www.markergene.com/>

Homepage da Markergene, empresa que comercializa diversos reagentes e *kits* moleculares, incluindo alguns para a detecção e análise de carboidratos de glicoproteínas.

Referências do Capítulo

Purificação de Glicoproteínas

Dulaney, J.T. Binding interactions of glycoproteins with lectins. *Mol. Cell. Biochem.*, 21:43-62, 1979.

Ausubel F.M.; Brent R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K.; Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc. 1998.

Ensaio de Interação com Receptores Acoplados à Proteína G

Hjorth, S.A.; Schambye, H.T.; Greenlee, W.J.; Schwartz, T.W. Identification of peptide binding residues in the extracellular domains of the AT₁ receptor. *J. Biol. Chem.*, 269:30953-30959, 1994.

Costa-Neto, C.M.; Miyakawa, A.A.; Oliveira, L.; Hjorth, S.A.; Schwartz, T.W.; Paiva, A.C. Mutational analysis of the interaction of the N- and C-terminal ends of angiotensin II with the rat AT₁ receptor. *Br. J. Pharmacol.*, 130:1263-1268, 2000.

Santos, E.L.; Pesquero, J.B.; Oliveira, L.; Paiva, A.C.M.; Costa-Neto, C.M. Mutagenesis of the AT₁ receptor reveals different binding modes of angiotensin II and [Sar1]-angiotensin II. *Regul. Peptides* 119:183-188, 2004.

Referências – Transfecção de Células de Mamíferos

Gether, U.; Johansen, T.E.; Schwartz, T.W. Chimeric, NK₁ (substance P)/NK₃ (neurokinin B) receptors – identification of domains determining the binding specificity of tachykinin. *J. Biol. Chem.*, 268:7893-7898, 1993.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

31. Identificação de Proteínas Fosforiladas

*Sandro Massao Hirabara
Esther Piltcher Haber
Rui Curi*

Introdução

A fosforilação é um mecanismo rápido, reversível e eficaz para regular a funcionalidade de várias proteínas envolvidas em inúmeros processos biológicos. Como exemplo, temos a atividade de enzimas e canais iônicos, a propagação de sinais intracelulares, a contração muscular, a expressão gênica e o crescimento, a diferenciação e a transformação celulares. Estima-se que um terço de nossas proteínas são dinâmicas e coordenadamente fosforiladas e desfosforiladas a cada instante. Proteínas quinases e proteínas fosfatases catalisam reações opostas neste processo. Enquanto as primeiras são responsáveis pela fosforilação, as segundas levam à desfosforilação de proteínas. Ambas têm suas atividades rígida e reciprocamente controladas por hormônios, fatores de crescimento e metabólitos, de forma a mudar o estado de fosforilação de proteínas específicas para atender as demandas fisiológicas em um dado momento.

Agrupamentos fosfatos são observados em vários aminoácidos. Os mais comuns e provavelmente os de maior relevância biológica em eucariotos compreendem a serina, a treonina e a tirosina, os quais são fosforilados no grupo hidroxil lateral (O-fosforilação). Estes são a principal meta deste capítulo. Já em procariotos, a histidina (N-fosforilação) e os carboxiaminoácidos aspartato e glutamato (adição de fosfato no agrupamento hidroxil terminal) parecem ser os de maior relevância. Outros fosfoaminoácidos compreendem a cisteína (S-fosforilada), a arginina e a lisina (N-fosforiladas).

Evolutivamente, as proteínas quinases derivaram de um único gene, o qual deu origem a duas famílias: as serina/treonina quinases e as tirosinas quinases. Já as proteínas fosfatases derivaram de dois genes ancestrais. Um deles originou as fosfoserinas/fosfotreoninas fosfatases e outro, as fosfotirosinas fosfatases (PTP). As

serina/treonina fosfatases, por sua vez, foram divididas em duas famílias: as fosfoserina/fosfotreonina proteínas fosfatases (PPP) e as proteínas fosfatases estimuladas por Mg^{2+} (PPM), enquanto a família PTP se subdividiu em PTP, com especificidade para fosfotirosinas, e PTP, com especificidade dual (para fosfoserina/fosfotreonina e fosfotirosina). Uma fosfo-histidina fosfatase foi descrita recentemente e considerada o primeiro membro de uma nova família: a proteína-histidina fosfatase (PHP).

Estruturalmente, tanto as proteínas quinases como as fosfatases apresentam ampla complexidade e diversidade. Estima-se que cerca de 518 dos nossos genes codificam proteínas quinases e entre 350 e 700 codificam proteínas fosfatases, demonstrando a alta variabilidade destas enzimas e, portanto, seu provável envolvimento em inúmeros fenômenos. Com relação à especificidade, estas são classificadas em dedicadas ou multifuncionais. As dedicadas são mais específicas, agindo sobre uma ou poucas proteínas com alta similaridade. Já as multifuncionais agem sobre várias proteínas, com apenas sequências-alvo relacionadas, geralmente envolvidas em vários processos. Dada a importância destas proteínas, o entendimento de suas estruturas, assim como sua regulação e determinação de seus substratos, são fundamentais para a compreensão dos mecanismos que regem os processos biológicos. Uma forma indireta de estudar as proteínas quinases e fosfatases é por meio da análise de proteínas fosforiladas, uma vez que estas representam o resultado de suas atividades.

Há várias técnicas que permitem o estudo de proteínas fosforiladas, como radiomarcagem com ^{32}P , análise por cromatografia (HPLC, TLC), fluorometria, espectrometria de massa, *Western blotting* (imunoblotting), imunoprecipitação, imunoistoquímica e imuno-fluorência. Usualmente, são requeridas mais de uma técnica para a obtenção de resultados mais precisos.

Radiomarcação com ^{32}P

Os primeiros estudos sobre a fosforilação de proteínas foram realizados utilizando fosfato radiomarcado. Este método baseia-se na incorporação de ^{32}P de ^{32}P fosfato ou $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ em proteínas de células permeabilizadas (*in vivo*) ou extratos celulares (*in vitro*). Geralmente, a análise inicial deste método é por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida para a separação das proteínas, a exposição do gel a filmes de raios X e a localização das fosfoproteínas por autorradiografia.

Fluorometria

Este método tem como princípio a marcação de grupos fosfatos ligados a proteínas com um fluoróforo. Uma desvantagem é que muitos fluoróforos também marcam outros fosfatos, como aqueles ligados a sacarídeos, ATP, ADP, nucleotídeos e metabólitos (por exemplo, glicose-6-fosfato). Porém, este problema pode ser contornado pela combinação desta técnica com a eletroforese em gel 2D, a qual permite a discriminação de fosfoproteínas de outras moléculas. Assim, a fluorometria associada à eletroforese em gel 2D é uma boa alternativa à técnica de radiomarcação com ^{32}P .

Identificação por Anticorpos

As técnicas que utilizam anticorpos compreendem o *Western blotting*, a imunoprecipitação, a imunoistoquímica e a imunofluorescência. Os anticorpos disponíveis no mercado apresentam especificidade variável. Existem anticorpos específicos para uma ou poucas proteínas com fosfoaminoácidos (por exemplo, antifosfo-Akt (ser473), o qual reconhece a proteína Akt fosforilada na serina 473, e antifosfo-MAP quinases p44/42 (thr202/tyr204), que reconhece as MAP quinases p44 e p42 fosforiladas em thr202/tyr204, respectivamente) e anticorpos com especificidade genérica para um fosfoaminoácido de várias proteínas (por exemplo, antifosfotirosina e antifosfotreonina, que reconhecem quaisquer resíduos de tirosina e treonina fosforilados, respectivamente). A escolha de um ou outro depende da finalidade do trabalho. Assim, por exemplo, quando se pretende analisar o perfil geral das proteínas fosforiladas em tirosina, qualquer uma das técnicas acima citadas pode ser utilizada. Já quando se pretende avaliar a fosforilação de um aminoácido de uma proteína específica, usualmente se utiliza um anticorpo específico contra este aminoácido. Neste caso, tanto o *Western blotting* como a imunoistoquímica e a imunofluorescência são relativamente discriminativos. A vantagem do *Western*

blotting é que, além do perfil geral, o peso molecular irá ajudar a distinguir a proteína de interesse, considerando que muitos anticorpos possuem ligações cruzadas ou inespecíficas.

Muitas proteínas são fosforiladas em aminoácidos localizados em sequências idênticas ou semelhantes, sendo que, neste caso, não há anticorpos específicos apenas para uma destas proteínas. Neste caso, somente a imunoprecipitação combinada com o *Western blotting* é capaz de discriminar uma destas proteínas. Para isso, deve-se primeiro realizar a imunoprecipitação da proteína de interesse previamente (usando um anticorpo específico para ela) e, em seguida, o *Western blotting* com o anticorpo contra o aminoácido fosforilado.

Identificação por Cromatografia

A hidrólise parcial alcalina, ácida e/ou enzimática de proteínas resulta na liberação de fosfoaminoácidos. Se as amostras forem previamente tratadas com ^{32}P , a detecção de fosfoaminoácidos pode ser realizada pela separação por TLC ou eletroforese em gel 1 ou 2D.

Os fosfoaminoácidos também podem ser derivatizados com reagentes cromatogênicos ou fluorogênicos e separados, detectados e quantificados por HPLC.

Identificação por Espectrometria de Massa

O princípio deste método é a detecção de fosfoproteínas ou fosfopeptídeos (gerados após digestão por fosfatase alcalina) pela massa diferencial entre as formas fosforilada e não fosforilada. Sua vantagem é a rapidez, pois dispensa a derivatização e o uso de radiomarcação.

Proteoma

Uma forma de análise emergente e promissora para o estudo da fosforilação de proteínas é o proteoma. Utiliza um conjunto de tecnologias para separar e identificar um grande número de proteínas, assim como estudar suas modificações (por exemplo, fosforilação). Um exemplo da combinação das técnicas utilizadas nesta forma de análise é o que segue:

1. Separação das proteínas de uma amostra por eletroforese em gel de poliacrilamida 2D.
2. Localização da(s) proteína(s) de interesse utilizando um mapa proteômico.

3. Isolamento e hidrólise parcial da(s) proteína(s) de interesse.
4. Detecção, identificação e quantificação de fosfoaminoácidos por HPLC.

Quando Proceder à Análise de Proteínas Fosforiladas?

Como descrito acima, a fosforilação e a desfosforilação estão presentes em inúmeros processos biológicos. Assim, a associação destes processos com o estado de fosforilação de determinadas proteínas pode ajudar a explicá-los. Como exemplos temos a associação entre o estado de fosforilação de enzimas e canais iônicos com suas atividades, a cascata de fosforilações e desfosforilações de proteínas que ocorrem nas vias de sinalização intracelular de hormônios e fatores de crescimento e influência de metabólitos, drogas ou outros fatores nessa sinalização ou na atividade de proteínas quinases e/ou fosfatases e, portanto, no estado de fosforilação de seus substratos.

A seguir, como exemplo, será descrita a sinalização da insulina e a análise da fosforilação da Akt (ser473), uma destas proteínas envolvida nesta sinalização, pela técnica de *Western blotting*.

Ativação e Modulação do Sinal Insulínico

As vias de sinalização envolvidas nas ações metabólicas da insulina são uma das mais conhecidas. A ação da insulina na célula inicia-se pela sua ligação ao receptor de membrana plasmática. Este receptor está presente em praticamente todos os tecidos dos mamíferos, mas suas concentrações variam desde 40 receptores nos eritrócitos circulantes até mais de 200.000 nas células adiposas e hepáticas. O receptor de insulina é uma glicoproteína heterotetramérica constituída de duas subunidades α e duas β , unidas por ligações dissulfeto. A subunidade α é inteiramente extracelular e contém o sítio de ligação da insulina. A subunidade β é uma proteína transmembrana responsável pela transmissão do sinal e apresenta atividade tirosina quinase. O ATP age como doador de fosfatos e a fosforilação ocorre em resíduos de tirosina. O mecanismo molecular exato da ação da insulina é desconhecido, mas parece depender da remoção do efeito inibitório da subunidade α sobre a atividade da subunidade β do seu receptor.

A insulina induz a autofosforilação do receptor, aumentando sua capacidade de fosforilar vários substratos protéicos intracelulares. As subunidades β fosforiladas permitem a ligação e fosforilação de substratos para o

receptor de insulina-1, 2, 3 e 4 (IRS-1, 2, 3 e 4), proteína derivada de colágeno com homologia ao Src (Shc), JAK-2, Vav e Gab-1. A fosforilação mediada pelo receptor dá início a uma série de eventos, incluindo a cascata de reações de fosforilação e desfosforilação que regula seus efeitos metabólicos e de crescimento.

Há uma estreita associação entre a enzima fosfatidilinositol-3-cinase (PI-3-cinase) com IRS-1 e 2 após a estimulação com a insulina. A PI-3-cinase é uma enzima que contém dois sítios SH2 e um SH3 e a molécula sinalizadora ativada mais bem estudada pela IRS-1. É uma serina/treonina cinase e tem um papel importante em muitos processos celulares, incluindo proliferação celular e captação de glicose. A molécula do IRS-1, quando fosforilada em tirosina, permite sua associação ao domínio SH2 da subunidade regulatória da PI-3-cinase, levando à ativação desta enzima. Esta enzima catalisa a fosforilação do fosfatidilinositol (PI), do fosfatidil-inositol-4-fosfato (PI-4P) e do fosfatidilinositol -4,5 -difosfato (PI-4,5P₂), os quais parecem ser requeridos para o transporte estimulado pela insulina.

Variação em Função do Tempo da Fosforilação em Serina (473) de Akt Estimulada pela Insulina em Músculo Sóleo *In Vitro*

Para o isolamento dos músculos sóleos, os ratos (140-160 g) são sacrificados por deslocamento cervical, seus músculos sóleos cuidadosa e rapidamente isolados, divididos longitudinalmente ao meio, pesados (20-30 mg) e pré-incubados em tampão bicarbonato de Krebs-Ringer contendo 5,6 mM de glicose, albumina sérica bovina a 1%, pH 7,4, por 30 min em banho-maria a 37°C, 95% O₂/5% CO₂ e agitação contínua (120 rpm). Após este período, os músculos são transferidos para outros frascos contendo o mesmo tampão e incubados por 0, 2, 5, 15, 30 e 60 min, com 10 mU/mL insulina, nas mesmas condições. Ao final da incubação, os músculos são imediatamente homogeneizados em 400 μ l de tampão de extração (100 mM de Trizma-base, pH 7,4; 10% de SDS; 10 mM de EDTA; 100 de NaF; 100 mM de pirofosfato de sódio e 10 mM de ortovanadato de sódio) a 100°C. Os homogenatos obtidos são fervidos por 5 minutos e imediatamente colocados em gelo. Os extratos são centrifugados a 12.000 rpm a 4°C por 40 minutos para a remoção do material insolúvel. Em seguida, os sobrenadantes são estocados com tampão de Laemmli contendo 100 mM de DTT, até a realização

do *Western blotting*. Outra alíquota de menor volume é utilizada para a quantificação da concentração proteica de cada amostra, pelo método de Bradford, usando a albumina sérica bovina como padrão.

Western Blotting com o Anticorpo Antifosfo-Akt (ser473)

A seguir, tem-se a descrição da variação em função do tempo da fosforilação em serina (473) de Akt estimulada pela insulina em músculo sóleo. Resultados observados na figura 31.1.

Setenta e cinco microgramas de extrato de músculo sóleo são submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE a 10%). Em cada gel haverá como padrão um marcador de peso molecular com valores es-

tabelecidos em miosina (217 kDa), β -galactosidase (123 kDa), albumina de soro bovino (71 kDa) e ovoalbumina (48 kDa).

A transferência das proteínas separadas no gel é feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose por 1 hora a 120 Volts. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose é diminuída pela incubação desta com uma solução bloqueadora (solução basal – 150 mM de NaCl, 10 mM de Trizma-base e *Tween* 20 a 0,02%, acrescida de 5% de leite desnatado) à temperatura ambiente por 2 horas. Estas membranas são subsequentemente lavadas em solução basal (três vezes de 10 min cada) e incubadas com o anticorpo antifosfo-Akt (ser473), diluído em solução basal acrescida de 3% de leite desnatado, a 4°C *overnight*. Segue-se a lavagem novamente e as membranas

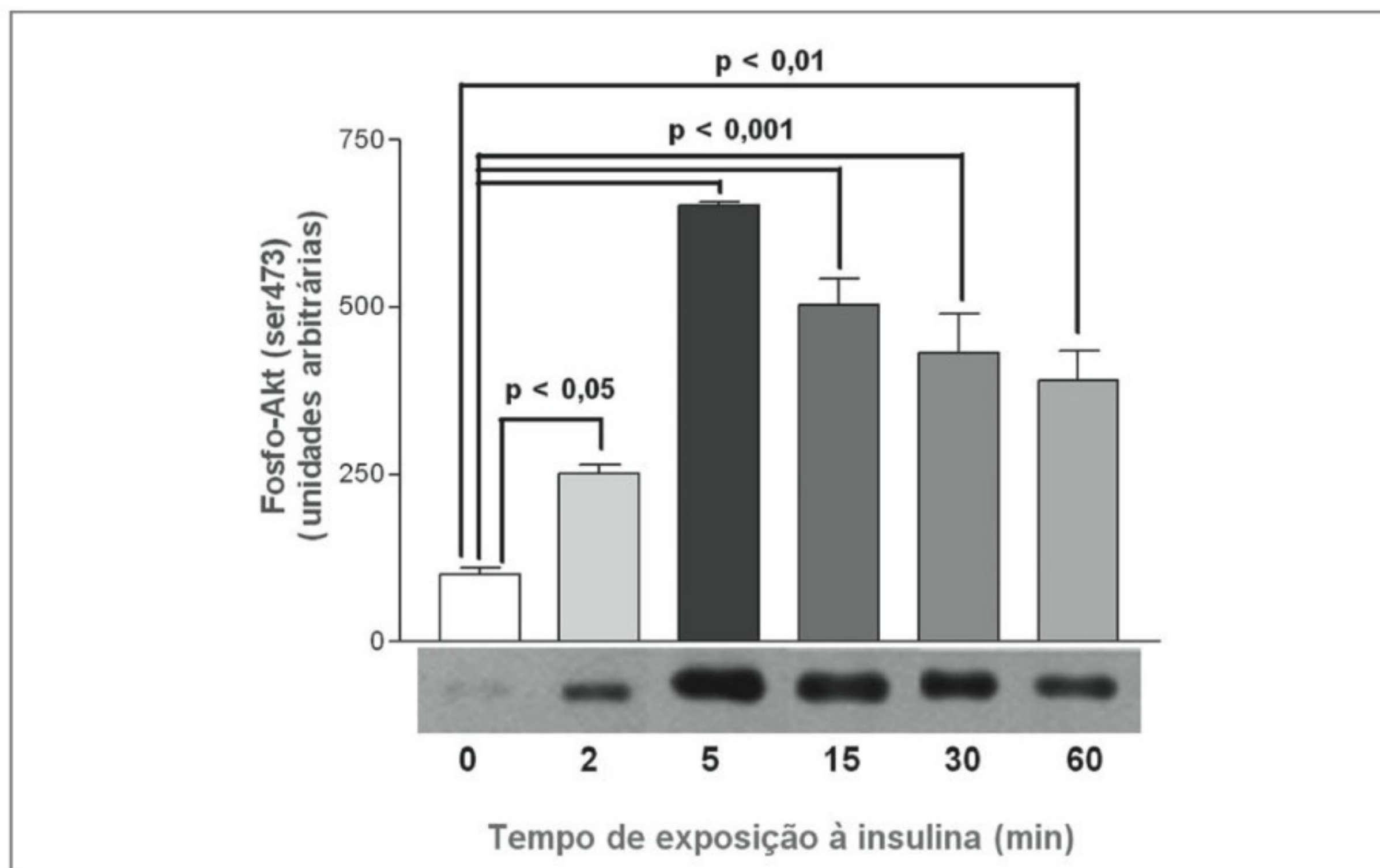


Figura 31.1 – Variação em função do tempo da fosforilação em serina (473) de Akt estimulada pela insulina em músculo sóleo. Os músculos foram pré-incubados em tampão bicarbonato de Krebs-Ringer contendo 5,6 mM de glicose e albumina a 1%, por 30 minutos, a 37°C e 95% de O₂. Em seguida, os músculos foram incubados no mesmo tampão por períodos de 0 a 60 minutos com 10 mU/mL de insulina. Ao término da incubação, os músculos foram imediatamente homogeneizados em tampão de extração a 100°C, fervidos por 5 minutos e centrifugados por 40 minutos a 12.000 rpm, a 4°C. Alíquotas de proteínas totais dos lisados musculares (75 µg) foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE a 10% e transferidas eletricamente para uma membrana de nitrocelulose. Conteúdo fosfo-Akt (ser473) foi visualizado por *Western blotting* usando anticorpo específico antifosfo-Akt (ser473). Os dados estão mostrados como média ± EPM de três experimentos. Uma autorradiografia representativa também é mostrada. (Cortesia do Dr. Sandro Massão Hirabara.)

são, então, incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase em solução basal acrescida de 1% de leite desnatado por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas são mais uma vez lavadas e processadas para reação de quimioluminescência e visualização das bandas reativas. A intensidade das bandas é quantificada por densitometria óptica nas autorradiografias.

Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos são analisadas pelo teste de Tukey, *one-way analysis of variance*. O nível de significância é determinado em $p < 0,05$.

Referências

- Adelstein, R.S.; Pato, M.D.; Sellers, J.R.; De Lanerolle, P.; Conti, M.A. Regulation of contractile proteins by reversible phosphorylation of myosin and myosin kinase. *Soc. Gen. Physiol. Ser.*, 37:273-81, 1982.
- Bonenfant, D.; Schmelzie, T.; Jacinto, E.; Crespo, J.L.; Mini, T.; Hall, M.N.; Jenoe, P. Quantification of changes in protein phosphorylation: A simple method based on stable isotope labeling and mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(3):880-5, 2003.
- Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-54, 1976.
- Carpenter, C.L.; Cantley, L.C. Phosphoinositide kinases. *Biochemistry*, 29:11147-56, 1990.
- Cheatham, B.; Kahn, C.R. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr. Rev.*, 16:117-38, 1995.
- Cohen, P. Protein phosphorylation and hormone action. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 234(1275):115-44, 1988.
- Cohen, P. Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. *Trends Biochem. Sci.*, 17(10):408-13, 1992.
- Cohen, P. The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity. *Nature*, 296(5858):613-20, 1982.
- Crowder, M.W.; Numan, A-Q.; Haddadian, F.; Weitzel, M.A.; Danielson, N.D. Capillary electrophoresis of phosphoamino acids with indirect photometric detection. *Analytica Chimica Acta*, 384:127-33, 1999.
- Davis, M.J.; Wu, X.; Nurkiewicz, T.R.; Kawasaki, J.; Gui, P.; Hill, M.A.; Wilson, E. Regulation of ion channels by protein tyrosine phosphorylation. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 281(5):H1835-62, 2001.
- Ek, P.; Pettersson, G.; Ek, B.; Gong, F.; Li, J.P.; Zetterqvist, Ö. Identification and characterization of a mammalian 14-kDa phosphohistidine phosphatase. *Eur. J. Biochem.*, 269(20):5016-23, 2002.
- El, Razi S.; Curi, R.; Carpinelli, A.R. Utilization of rat and human sera to carry out incubation and perfusion of pancreatic islets. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 28(4):181-4, 1992.
- Folli, F.; Saad, M.J.A.; Backer, J.M.; Kahn, C.R. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat. *J. Biol. Chem.*, 267:22171-7, 1992.
- Kahn, C.R. Current concepts of the molecular mechanism of insulin action. *Ann. Rev. of Med.*, 36:429-51, 1985.
- Kasuga, M.; Karlsson, F.A.; Kahn, C.R. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science*, 215:185-7, 1982.
- Kurosawa, M. Phosphorylation and dephosphorylation of protein in regulating cellular function. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 31(3):135-9, 1994.
- Laemli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-5, 1970.
- Li, L.; Shakhnovith, E.I.; Mirny, L.A. Amino acids determining enzyme-substrate specificity in prokaryotic and eukaryotic protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(8):4463-8, 2003.
- Pinna, L.A. Structural basis for the specificity of protein phosphorylation and dephosphorylation processes. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 231:433-43, 1988.
- Ruderman, N.; Kapeller, R.; White, M.F.; Cantley, L.C. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:1411-5, 1990.
- Shenolikar, S. Control of cell function by reversible protein phosphorylation. *Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res*, 11(7):531-41, 1986.
- Sparks, J.W.; Brautigan, D.L. Molecular basis for substrate specificity of protein kinases and phosphatases. *Int. J. Biochem.*, 18(6):497-504, 1986.
- Sun, X.J.; Rothenberg, P.; Kahn, C.R.; Backer, J.M.; Araki, E.; Wilden, P.A.; Cahill, D.A.; Goldstein, B.J.; White, M.F. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature*, 352:73-77, 1991.
- Tokuda, M.; Hatase, O. Regulation of neuronal plasticity in the central nervous system by phosphorylation and dephosphorylation. *Mol. Neurobiol.*, 17(1-3):137-56, 1998.
- Towbin, H.; Staehlin, J.; Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76:4350-54, 1979.
- White, M.F.; Kahn, C.R. The insulin signaling system. *J. Biol. Chem.*, 261:1-4, 1994.
- White, M.F. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia*, 40:S2-S17, 1997.

- Whitmarsh, A.J.; Davis, R.J. Regulation of transcription factor function by phosphorylation. *Cell Mol. Life Sci.*, 57(8-9):1172-83, 2000.
- Witte, P.A.; Cuveele, J.F.; Merlevede, W.J.; Agostinis, P.M. Analysis of the phosphoamino acid content of phosphoproteins. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 14:1063-7, 1996.
- Yan, J.X.; Packer, N.H.; Gooley, A.A.; Williams, K.L. Protein Phosphorylation: technologies for the identification of phosphoamino acids. *J. Chromatogr.*, 808:23-41, 1998.
- Yan, J.X.; Packer, N.H.; Tonella, L.; Ou, K.; Wilkins, M.R.; Sanchez, J-C.; Gooley, A.A.; Hochstrasser, D.F.; Williams, K.L. High sample throughput phosphoamino acid analysis of proteins separated by one- and two-dimensional gel electrophoresis. *J. Chromatogr.*, 764:201-10, 1997.
- Zolnierowicz, S.; Bollen, M. Protein phosphorylation and protein phosphatases. *EMBO J.*, 19(4):483-8, 2000.

32. Detecção de Proteínas S-Nitrosiladas

*Luiz Claudio Godoy
Heraldo Possolo de Souza*

Introdução

A formação de nitrosotióis proteicos, produtos da interação entre óxido nítrico (NO), ou espécies dele derivadas, e grupos tióis (-SH) proteicos, representa um mecanismo importante de modificação pós-traducional de proteínas envolvidas na transdução de sinal. O NO é produzido por quase todos os tipos celulares e interage com diversas vias de sinalização. Sua ação sobre tióis proteicos, ao lado de sua capacidade de reagir com centros metálicos, propicia uma moldura adequada para explicar seus múltiplos efeitos.

O NO pode oxidar, nitrar ou nitrosilar proteínas. Nitração refere-se à ligação de nitrito (NO_2) a um resíduo de tirosina ou, menos frequentemente, triptofano. Nitrosilação, por outro lado, consiste na ligação de NO a um metal de transição ou grupo tiol, geralmente em um resíduo de cisteína (S-nitrosilação). A nitração é um processo irreversível que pode ser responsável por efeitos nocivos do NO, diferentemente da nitrosilação, que é uma alteração reversível envolvida na sinalização celular. Reações de nitrosilação de grupos tióis ou metais de transição podem levar tanto à ativação quanto à desativação de proteínas.

Enquanto modificações pós-traducionais mais clássicas, como a fosforilação e a acetilação, dependem de enzimas, a nitrosilação é, ao menos em parte, um processo não enzimático. O fator que parece mediar a nitrosilação é, na verdade, o ambiente redox intracelular. Além disso, da mesma maneira que a fosforilação é revertida por desfosforilação, a nitrosilação o é por denitrosilação. Mais uma vez, porém, distintamente da desfosforilação, a denitrosilação ocorre de modo não enzimático, em função da sensibilidade das ligações S-NO e metal-NO ao equilíbrio redox. Uma variedade de fatores, incluindo metais de transição, agentes redutores, mudanças de pH e pO_2 e luz ultravioleta (UV) pode levar à perda das ligações S-NO e/

ou metal-NO. Assim, a denitrosilação pode simplesmente ocorrer devido a alterações no ambiente redox.

A bioquímica envolvida na formação de nitrosotióis em ambiente fisiológico ainda não está completamente esclarecida. S-nitrosotióis (S-NO) podem ser formados pela interação com (Fig. 32.1):

1. Oxidantes (como oxigênio molecular e superóxido), via formação intermediária de óxidos de nitrogênio (como dióxido de nitrogênio, trióxido de dinitrogênio e peroxinitrito).
2. Tióis reduzidos, via formação de um radical intermediário RSNOH.
3. Centros metálicos (como cobre ou ferro) tanto operando como catalisadores como através da geração do cátion nitrosônio.

Um dado importante é o fato de essas reações ocorrerem, com maior probabilidade, nas proximidades do local em que o NO é produzido. Dessa forma, a nitrosilação proteica é dependente da formação e colocalização de tióis reduzidos, NO e seus equivalentes no ambiente intracelular. Por exemplo, as reações entre NO e O_2 são aceleradas 300 vezes nas membranas lipídicas, levando à produção aumentada de equivalentes de NO^+ , NO_2 e N_2O_3 . Assim, proteínas inseridas na membrana são alvos prováveis da S-nitrosilação mediada por NO_2 e N_2O_3 .

Apesar de ocorrer de forma não enzimática, a S-nitrosilação é bastante específica, tendo como alvo resíduos de cisteína com características únicas. O confinamento da geração de NO e seus alvos em um mesmo compartimento subcelular, conforme discutido acima, é um mecanismo que confere especificidade à reação de S-nitrosilação e, assim, a localização subcelular pode definir se resíduos de cisteína em uma proteína podem ser alvo de S-nitrosilação ou não. A compartimentalização subcelular é um mecanismo necessário, porém

não suficiente, para conferir especificidade às reações de S-nitrosilação. Estão descritas sequências de aminoácidos que facilitam a ocorrência dessa reação. A presença de um aminoácido básico (lisina, arginina ou histidina) e um ácido (aspartato ou glutamato) ladeando o resíduo de cisteína parece favorecer a S-nitrosilação. Essa disposição dos aminoácidos pode ocorrer tanto na estrutura primária da proteína quanto na terciária.

Um fenômeno ainda pouco explorado é o fato de a formação de S-NO também poder ocorrer por transnitrosilação, na qual grupamentos NO são diretamente transferidos de um tiol para outro. Algumas enzimas, como a recém-descrita nitrosoglutationa redutase, são capazes de catalisar essa reação.

Técnicas para Detecção de Proteínas S-Nitrosiladas

As baixas concentrações e a instabilidade da ligação S-NO faz com que a detecção de proteínas nitrosiladas em sistemas biológicos seja uma tarefa complexa. Cada método tem suas limitações, e nenhum deles pode ser considerado incontestável. Assim, é recomendado que as medidas de S-nitrosilação sejam confirmadas usando-se pelo menos dois métodos distintos. Além disso, uma vez que as ligações S-NO e metal-NO são sensíveis às variações redox, deve-se tomar grande cuidado durante a preparação das amostras, de modo a evitar perda e/ou ganho de ligações S-NO e metal-NO como consequência de artefatos técnicos.

As técnicas usadas para a detecção de S-nitrosilação endógena baseiam-se nas propriedades do ligação S-NO e em diferentes princípios (Fig. 32.2):

1. Detecção direta da ligação S-NO por meio de anticorpos antinitrosocisteína.
2. Derivatização baseada na troca dos grupamentos S-NO por S-biotina.
3. Detecção do NO liberado de proteínas após a redução do grupamento S-NO com HgCl_2 , seja por quimioluminescência seja por espectrometria de massa.
4. Detecção de óxidos de nitrogênio por absorvância (reação de Griess) ou fluorescência (reação com 2,3-diaminonaftaleno – DAN).

Todos os métodos citados acima têm vantagens e desvantagens. A reação de Griess (método de Saville) pode ser usada para a quantificação indireta de nitrosotíóis. O NO_2 formado a partir do NO é quantificado com base em curva-padrão. A concentração de nitro-

sotíóis é calculada considerando-se o aumento na leitura de absorvância a 545 nm quando as amostras são tratadas com HgCl_2 , que decompõe especificamente as ligações S-NO. Embora o ensaio seja de fácil execução, sofre grande interferência de agentes redutores.

Nos ensaios com DAN e DAF-2, as proteínas S-nitrosiladas são tratadas com HgCl_2 , de modo a liberar NO dos nitrosotíóis. O NO livre reage com DAN ou DAF-2 gerando produtos fluorescentes. O grau de fluorescência é proporcional à quantidade de NO liberada em cada amostra. Este ensaio é menos sensível do que o de redução química/quimioluminescência, mas tem a vantagem de prescindir de um analisador de NO (Sievers).

A imunodetecção de nitrosotíóis tem sido realizada com um antissoro produzido em coelhos contra S-nitrosocisteína, disponível comercialmente. Entretanto, alguns problemas podem advir da instabilidade do sítio de ligação destes anticorpos, ou seja, os nitrosotíóis. Tem-se relatado, por exemplo, que este antissoro pode eventualmente detectar tíóis não modificados. Portanto, controles apropriados devem ser adotados para se assegurar a especificidade das marcações em ensaios de imunofluorescência, imunoisto/citoquímica e *Western blotting*.

Além dos métodos citados, a nitrosilação de metais pode ser estudada após imunoprecipitação em proteínas que contêm grupos metálicos. Para isso, tem-se utilizado espectrometria de absorvância (UV-visível) ou ressonância paramagnética eletrônica (EPR).

A seguir, descreveremos, com mais detalhes, os métodos mais recentes e mais específicos utilizados para o estudo de proteínas S-nitrosiladas *in vitro*.

Biotin Switch

A técnica de *biotin switch* baseia-se na marcação de proteínas com biotina especificamente nas cisteínas S-nitrosiladas. No primeiro passo, tíóis livres são bloqueados pela incubação com um agente metiltiolante (metilmetanotiosulfato, MMTS ou N-etilmaleimida, NEM) que não reage com nitrosotíóis ou pontes dissulfeto preexistentes. Em seguida, os nitrosotíóis são reduzidos a tíóis com ascorbato e então estes tíóis reagem com agentes que biotinilam especificamente grupos sulfidríla, como N-[6-(biotinamido)hexil]-3'-(2'-piridiliditio) propionamida (biotina-HPDP) ou N-(3-maleimidopropionil) biocitina (MPB). As proteínas marcadas podem, assim, ser purificadas usando-se estreptavidina imobilizada e/ou estudada por *Western blotting* com anticorpos antibiotina. O protocolo aqui apresentado é uma versão modificada do originalmente proposto por Jaffrey

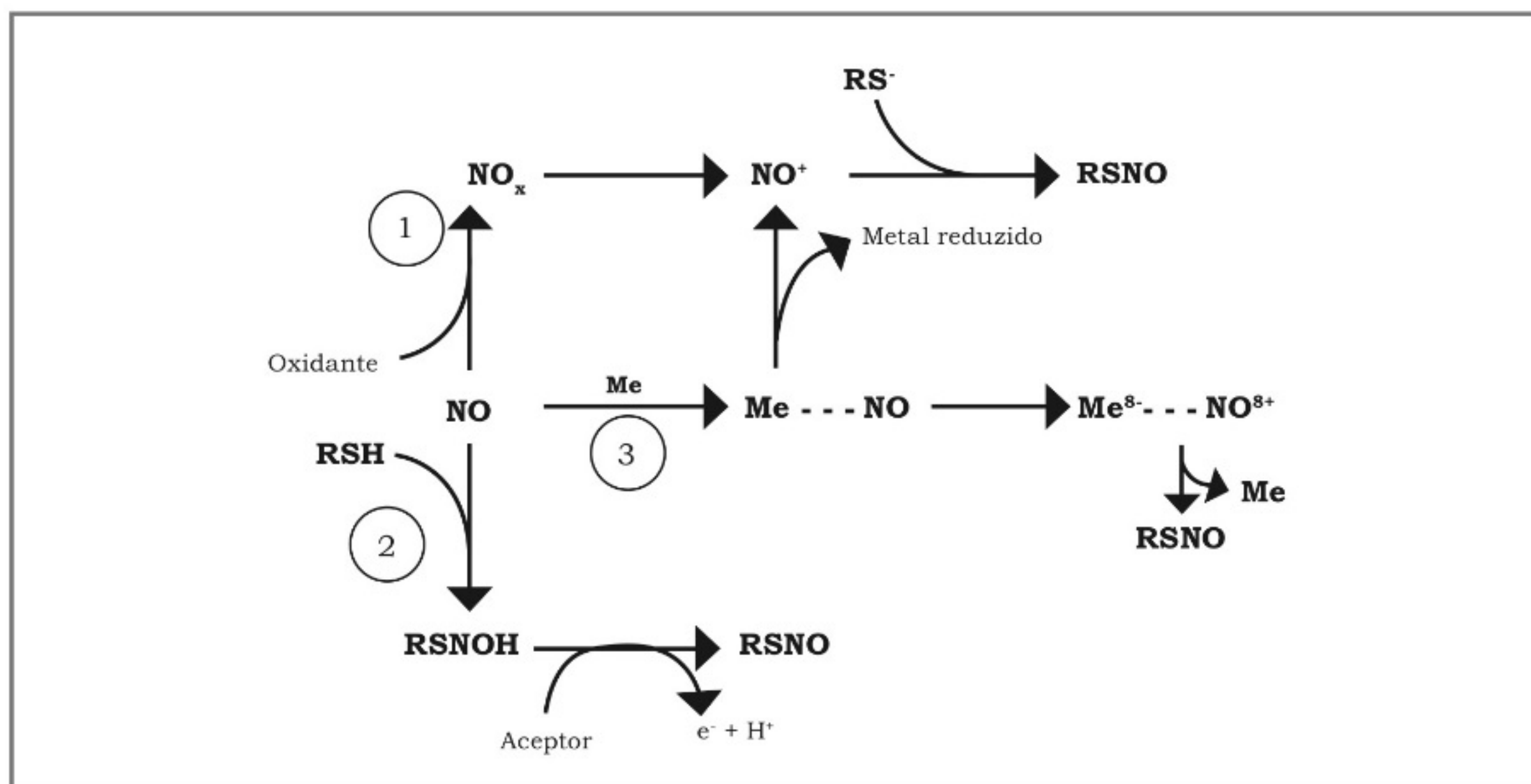


Figura 32.1 – Mecanismo da formação de nitrosotióis proteicos (adaptado de Gow et al., 2004)

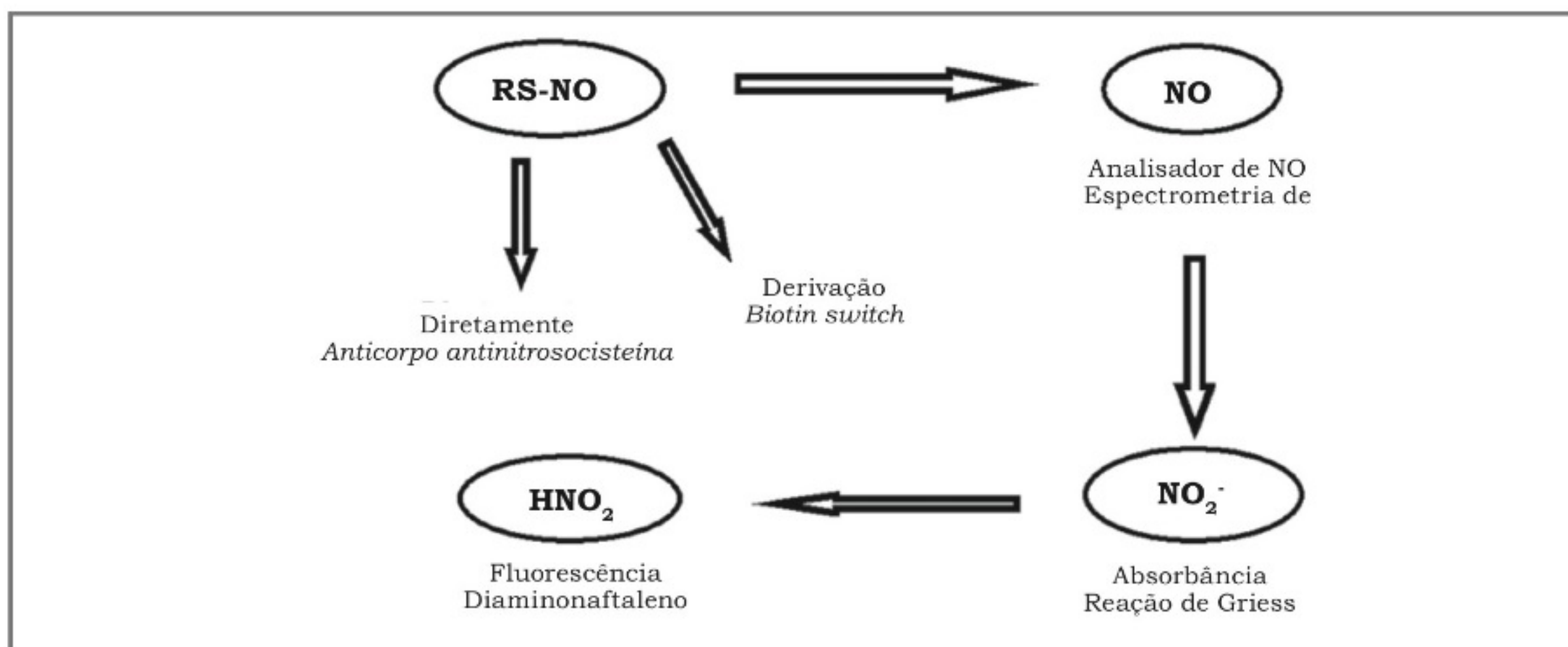


Figura 32.2 – Métodos para a detecção de proteínas nitrosiladas.

e Snyder (2001). As modificações consistem basicamente no acoplamento de algumas etapas (como é o caso da lise celular associada ao bloqueio dos tióis livres, que no protocolo original é feito separadamente), de modo a possibilitar a realização da técnica em menor tempo.

Material

PBS + neocuproína + EDTA (manter a 4°C)

EDTA	1 mM
Neocuproína	0,1 mM
PBS	q.s.p. 1 L

HEN “super”

HEPES	250 mM
EDTA	1 mM
Neocuproína	0,1 mM
Água destilada	q.s.p. 1 L

HEN

HEPES	25 mM
EDTA	1 mM
Neocuproína	0,1 mM
Água destilada	q.s.p. 1 L

Tampão de lise (preparar imediatamente antes do uso)

CHAPS	0,5%	500 µL de uma solução-estoque a 10%
SDS	1%	1 mL de uma solução-estoque a 10%
NEM	20 mM	
HEN “super”		q.s.p. 10 mL
HENS “super”		
SDS	1%	4 mL de uma solução-estoque a 25%
HEN “super”		q.s.p. 100 mL
HENS		
SDS	1%	4 mL de uma solução-estoque a 25%
HEN		q.s.p. 100 mL

Ascorbato (preparar imediatamente antes do uso)

Ascorbato de sódio 100 mM em HEN “super”

MPB

MPB a 500 µM em HEN “super”

Amostras

Amostras proteicas podem ser obtidas de homogenizados de tecido ou células em cultura. Proteínas puri-

ficadas também podem ser submetidas à técnica, desde que estejam ausentes tióis contaminantes de baixo peso molecular, como 2-mercaptoetanol, DTT ou GSH. No caso de proteínas purificadas, estas devem ser dialisadas contra tampão HEN. Todos os procedimentos até o término da etapa 6 do protocolo abaixo devem ser realizadas evitando-se exposição das amostras à luz.

S-Nitrosilação *In Vitro*

O estudo de amostras proteicas expostas a doadores de NO *in vitro* pode ser feito paralelamente ao de proteínas nitrosiladas por processos endógenos. Vários doadores de NO estão disponíveis comercialmente, como S-nitrosoglutathione (GSNO), S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) e 1-[2-(2-aminoetil)-N-(2-amônioetil)amino]diazen-1-ium, 2-diolato (DETA NONOato).

É recomendável que a concentração de doador de NO fique em torno de 1 µM, por se aproximar mais das condições fisiológicas encontradas em um organismo. A inclusão de um controle negativo na forma de um doador de NO inativo de NO também é aconselhável. Quando o doador de NO é GSNO, por exemplo, este controle pode ser feito com GSH na mesma concentração.

A exposição ao doador de NO pode ser feita em temperatura ambiente ou a 37°C. Contudo, deve-se observar que cada doador de NO possui uma cinética de liberação de NO diferente, dependente de temperatura, pH etc.

Biotinilação de Proteínas S-nitrosiladas

Obs: O protocolo que segue foi desenvolvido para células de cultura. Porém, uma vez que se tenha um extrato proteico proveniente de homogenado de tecido ou proteína purificada, as etapas do procedimento são facilmente adaptáveis.

1. Lavar as células de 5 placas (60 mm) de cultura três vezes banhando-as com PBS-EDTA-neocuproína em agitador a 4°C por 5 minutos.
2. Lise/bloqueio: adicionar 200 µL de tampão de lise, raspar as células e transferir o material para tubos de microcentrifuga; incubar por 30 minutos a 4°C em agitador.
3. Remoção do excesso de NEM: adicionar duas partes de acetona gelada para cada parte de lisado e manter a -20°C por 20 minutos; centrifugar a 14.000× g, 4°C por 10 minutos.

4. Descartar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 200 μ L de HENS “super”, desfazendo o precipitado por pipetagens sucessivas.
5. Determinar a concentração proteica por método compatível com os reagentes do tampão de lise (exemplo, Lowry).
6. Separar 200 μ g de proteína em um volume de 400 μ L de HENS “super” e adicionar 50 μ L de ascorbato 100 mM (concentração final: 10 mM) e 50 μ L de MPB 500 μ M (concentração final 50 μ M). Incubar por 1 h em temperatura ambiente.
7. Remoção do excesso de MPB: adicionar duas partes de acetona gelada para cada parte da preparação e manter a -20°C por 20 minutos; centrifugar a $14000 \times g$, 4°C por 10 minutos.
8. Descartar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 200 μ L de HENS.
9. Determinar a concentração proteica por método compatível com os componentes do tampão (exemplo, Lowry).

Ao final do método, tem-se um extrato proteico no qual todas as proteínas inicialmente nitrosiladas encontram-se marcadas com biotina. De acordo com o objetivo da investigação, podem-se realizar diferentes tipos de análise posterior. Como exemplo, pode-se analisar o extrato total (ou mesmo proteínas imunoprecipitadas destes extratos) por *Western blotting*, usando-se anticorpo anti-biotina-HRP ou diretamente com um conjugado de estreptavidina-peroxidase.

Controles

Alguns controles são fundamentais para a certificação de que a técnica do *biotin switch* está operando corretamente. Acima, já foi citada a utilização de doadores inativos de NO quando se fazem ensaios com exposição a doadores de NO. Além disso, a supressão do agente biotinilador (como o MPB, neste protocolo) e do ascorbato pode ajudar a distinguir entre proteínas biotiniladas endogenamente e as marcadas pela técnica. Finalmente, a confirmação de que o sinal de S-nitrosilação endógena é realmente devido à atividade da NO sintase pode ser obtida quando se utiliza material proveniente de animais *knockout* para esta enzima, ou utilizando-se inibidores da síntese de NO, como L-NAME, L-NMA, 1.400W e outros.

Redução/Quimioluminescência

No ensaio de redução química/quimioluminescência, o NO é liberado de proteínas S-nitrosiladas usando-se agentes redutores, como o HgCl_2 . O NO liberado reage com o oxigênio dissolvido e forma o produto estável NO_2 . Quando as amostras são tratadas com iodeto de potássio (KI) em ácido acético, o NO_2 é novamente reduzido a NO. Uma vez que a amostra é injetada no analisador, ocorre a reação do NO com ozônio, o que gera a quimioluminescência detectada pelo aparelho. Este ensaio é o mais adequado para a detecção de níveis baixos de nitrosilação. Entretanto, possui duas limitações: o equipamento (analisador de NO Sievers) não está disponível na maioria dos laboratórios e a metodologia é aplicável somente no estudo de proteínas purificadas. O protocolo a seguir é o sugerido por Mannick e Schonhoff (2004).

Material

- Células expressando a proteína de interesse.
- PBS.
- Tampão de lise (manter a 4°C):
 - NaCl a 150 mM;
 - NP-40 a 1% (v/v);
 - Tris-HCl a 50 mM, pH 8,0;
 - Inibidores de protease: leupeptina 10 μ g/mL, aprotinina 5 μ g/mL, PMSF 1 mM.
- Proteína A ou G conjugadas a Sepharose 2 mg/mL.
- Soro normal de coelho 0,4 μ g/mL.
- Anticorpo contra a proteína de interesse e anticorpo controle de mesmo isotipo.
- Tampão de lise *high salt* (manter em gelo):
 - NaCl a 500 mM;
 - NP-40 a 1% (v/v);
 - Tris-HCl pH 8,0.

Adicionar no momento de usar: NEM 1mM (de uma solução estoque 100mM em etanol) e inibidores e protease

- PBS contendo 1 mM de EDTA.
- Tampão de amostra para SDS-PAGE.
- Tampão glicina para eluição: glicina 100 mM, pH 3,0 (aquecer a solução a 95°C em tubo fechado por 2 h, para diminuir a contaminação por nitrito, e então resfriar a 4°C para utilizá-la).

- Albumina sérica bovina (BSA).
- Ácido acético glacial.
- Gás hélio ou argônio.
- Agente antiespumante diluído 1:30 em água gelada.
- HgCl_2 a 100 mM.
- NaNO_2 .

Preparação do Lisado Celular

1. Coletar 1×10^8 células (o número de células dependerá do nível de expressão da proteína de interesse), centrifugá-las (10 minutos a 4°C , $300\times g$) e descartar o sobrenadante. Ressuspender em PBS gelado e lavar por meio de nova centrifugação.
2. Lisar o sedimento celular com 1,0 a 1,5 mL de tampão de lise contendo os inibidores de protease recém-diluídos. Incubar os lisados a 4°C abrigados da luz sob agitação por 30 minutos. Enquanto isso, preparar os *beads* para a imunoprecipitação (Etapa 4).
3. Remover o *debris* insolúvel dos lisados centrifugando por 10 minutos a 4°C , $14.000\times g$. Em banho de gelo, dividir os sobrenadantes em duas partes iguais em tubos de microcentrífuga e mantê-los no escuro até que os *beads* estejam prontos. Não deixar no gelo por mais que 30 minutos.

Preparação dos beads

Obs: Esta etapa garante que proteínas que reagem inespecificamente com os *beads* usados na imunoprecipitação sejam eliminadas do processo.

4. Ressuspender 0,5 mL da suspensão de proteína A(G)-Sepharose em 0,5 mL de lise em tubos de 1,5 mL em banho de gelo. Após a sedimentação dos *beads*, remover o sobrenadante. Repetir este procedimento três vezes. Ressuspender os *beads* num volume de tampão de lise igual ao volume dos *beads*. Incubar 50 μL da suspensão de *beads* com 50 μL do soro de coelho mais 300 μL de tampão de lise a 4°C , sob agitação por 30 minutos. Centrifugar por 2 a 3 s em microcentrífuga, remover o sobrenadante e ressuspender os sedimento em 1 mL de tampão de lise. Centrifugar novamente por 2 a 3 s e descartar o sobrenadante. Repetir estas lavagens três vezes. Após a última lavagem, ressuspender os *beads* em 50 μL de tampão de lise.
5. Adicionar 25 μL da suspensão de *beads* assim lavada a cada uma das duas alíquotas de lisado preparado na etapa 3. Incubar sob agitação por 2 horas a 4°C no escuro, agitando.
6. Centrifugar por 2 a 3 s em microcentrífuga e transferir os sobrenadantes para tubos em banho de gelo, descartando os *beads*.

Imunoprecipitação da proteína de interesse

7. Adicionar a quantidade adequada de anticorpo contra a proteína a ser isolada a uma das alíquotas de lisado e, à outra, igual quantidade de anticorpo controle de mesmo isotipo. Incubar *overnight* no escuro a 4°C sob agitação.
8. Depois da incubação, adicionar 50 μL de suspensão de proteína A (G)-Sepharose a cada tubo e incubar por 2 horas no escuro a 4°C sob agitação.
9. Centrifugar por 2 a 3 s em microcentrífuga, remover o sobrenadante e lavar os *beads* quatro vezes por centrifugação com 1 mL de tampão de lise *high salt*, sempre descartando o sobrenadante. Depois da quarta lavagem, ressuspender os *beads* em 1 mL de tampão de lise *high salt*.
10. Transferir 100 μL de cada suspensão de imunoprecipitado para um novo tubo, adicionar 900 μL de PBS contendo EDTA 1 mM. Recuperar os *beads* após centrifugar em microcentrífuga por 2 a 3 s, descartando o sobrenadante.
11. Adicionar 1 volume (aproximadamente 25 μL) de tampão de amostra duas vezes (SDS-PAGE) a cada tubo e incubar por 3 a 5 minutos em banho de água fervente (estas amostras serão usadas para análise em géis posteriormente corados por impregnação com prata).
12. Centrifugar os 900 μL restantes de imunoprecipitado da etapa 10 por 2 a 3 s em microcentrífuga. Descartar o sobrenadante.
13. Eluir os complexos antígeno-anticorpo dos *beads* adicionando 70 μL do tampão glicina para eluição e incubando por 10 minutos no escuro em banho de gelo.
14. Centrifugar em microcentrífuga por 2 a 3 s e transferir o sobrenadante contendo as proteínas eluídas para outro tubo em banho de gelo no escuro. Repetir a etapa 13 mais duas vezes e juntar o eluato ao coletado anteriormente. Armazenar os *pools* (aproximadamente 210 μL) a -80°C por até uma semana até o momento do ensaio de redução química/quimioluminescência.

Análise dos imunoprecipitados por coloração com prata

15. Preparar uma diluição seriada (cobrindo de 500 ng a 4 ng) a partir de uma concentração conhecida da proteína de interesse em PBS. Se preparações purificadas da proteína de interesse não estiverem disponíveis, realizar o procedimento com BSA. Adicionar igual volume de tampão de amostra duas a cada diluição e aquecer em banho de água fervente.
16. Carregar as amostras contendo 1/10 de cada imunoprecipitado (etapa 11) e as diluições seriadas da proteína-padrão (item anterior) em gel de poliacrilamida e separar as proteínas por SDS-PAGE.
17. Corar os géis por impregnação com prata. Determinar a quantidade de proteína em cada imunoprecipitado comparando a intensidade das bandas no imunoprecipitado com a das bandas correspondendo às concentrações conhecidas da proteína padrão. Verificar, ainda, a presença de proteínas contaminantes nos imunoprecipitados. É importante para as medidas de nitrosilação que a proteína de interesse seja virtualmente a única proteína precipitada pelo seu anticorpo específico, e não pelo anticorpo controle.

Ensaio de redução química/quimioluminescência

18. Pipetar 5 mL de ácido acético glacial no *purge vessel* do analisador de NO. Borbulhar com argônio ou hélio por alguns minutos, de acordo com as instruções da seção de redução de nitrito do manual de operação do equipamento.
19. Adicionar 1 mL da solução de KI ao *purge vessel* e deixar borbulhar por mais alguns minutos. Adicionar 100 mL do agente antiespumante ao *purge vessel*. Fechar o sistema e permitir que a leitura basal se estabilize.
20. Para a curva-padrão, fazer diluições seriadas de NaNO₂ em água (1 µM a 15 µM). Introduzir 50 µL do primeiro padrão na câmara de reação do analisador de NO usando uma seringa Hamilton, conforme a descrição do manual do aparelho. O sistema registrará o NO liberado de cada amostra à medida que o sinal de quimioluminescência é medido no eixo *y* versus o tempo pelo qual o sinal é medido no eixo *x*. A área sob cada curva é proporcional à quan-

alisador para gerar a curva-padrão, que será usada para calcular a concentração de NO nas amostras subsequentes.

21. Dividir cada amostra de eluato contendo o complexo antígeno/anticorpo (etapa 14) em duas alíquotas iguais. Adicionar HgCl₂ 100 mM a uma das alíquotas de modo a obter uma concentração final de 2,2 mM e incubar por 10 minutos em temperatura ambiente, no escuro.
22. Introduzir 50 µL de cada amostra na câmara de reação usando seringa Hamilton. O analisador registrará o sinal de quimioluminescência de NO de cada amostra. O comando *Calculate Concentrations* do analisador é então usado para calcular a concentração de NO de cada amostra. O sinal de NO das amostras não tratadas com HgCl₂ é gerado pelo nitrito já presente nas amostras (*background*). O aumento no sinal de NO em relação ao *background* nas amostras tratadas com HgCl₂ é o sinal específico de S-nitrosilação.

Ensaio com DAN

Uma vez que o analisador de NO (Sievers) citado no protocolo anterior não está disponível em todos os laboratórios, uma alternativa é apresentada a seguir. Neste ensaio, o DAN (2,3-diaminonaftaleno) reage com o NO⁺ liberado das ligações SNO por tratamento com HgCl₂ formando um produto fluorescente. A intensidade de fluorescência do DAN é proporcional à quantidade de SNO em cada amostra. A desvantagem do ensaio com DAN é a baixa sensibilidade se comparada com o ensaio de redução química/quimioluminescência. Assim, proteínas endogenamente nitrosiladas que sejam instáveis ou não muito abundantes podem não ser detectadas por meio deste ensaio. O protocolo a seguir é o sugerido por Mannick e Schonhoff (2004).

Material

- DAN a 10 mM em dimetilformamida (DMF) ou dimetilsulfóxido (DMSO) (armazenar a -20°C).
 - HgCl₂ a 10 mM em água.
 - NaOH a 1 N.
1. Imunoprecipitar a proteína de interesse conforme descrito no protocolo anterior e analisar os imuno-

duas alíquotas iguais. A uma delas adicionar DAN na concentração final de 100 μM ; à outra, adicionar HgCl_2 na concentração final de 100 μM e DAN, também a 100 μM final. Incubar as amostras no escuro por 30 minutos em temperatura ambiente sob agitação moderada.

3. A cada amostra, adicionar NaOH na concentração final de 0,1 N.
4. Medir a intensidade de fluorescência em fluorímetro com excitação de 375 nm e detecção a 450 nm.
5. Subtrair a intensidade de fluorescência gerada nas amostras em ausência de HgCl_2 (*background*) dos valores medidos nas amostras tratadas com HgCl_2 para determinar a fluorescência especificamente gerada por S-NO em cada amostra. Fazer uma curva-padrão usando concentrações conhecidas de proteínas nitrosiladas *in vitro* ou GSNO.

Referências

- Alpert, C.; Ramdev, N.; George, D.; Loscalzo, J. Detection of S-nitrosothiols and other nitric oxide derivatives by photolysis-chemiluminescence spectrometry. *Anal. Biochem.*, 245:1-7, 1997.
- Bryan, N.S.; Rassaf, T.; Maloney, R.E.; Rodriguez, C.M.; Saijo, F.; Rodriguez, J.R.; Feelisch, M. Cellular targets and mechanisms of nitrosylation: an insight into their nature and kinetics in vivo. *PNAS*, 101(12): 4308-4313, 2004.
- Fang, K.; Ragsdale, N.V.; Carey, R.M.; MacDonald, T.; Gaston, B. Reductive assays for S-nitrosothiols: implications for measurements in biological systems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 252:535-540, 1998.
- Feelisch, M.; Rassaf, T.; Mnaimneh, S.; Singh, N.; Bryan, N.S.; Jour'd'Hevil, D. Concomitant S-, N-, and heme-nitrosylation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. *FASEB J.*, 16(13):1775-1785, 2002.
- Gow, A.J.; Chen, Q.; Hess, D.T.; Day, B.J.; Ischiropoulos, H.; Stamler, J.S. Basal and stimulated protein S-nitrosylation in multiple cell types and tissues. *J. Biol. Chem.*, 277:9637-9640, 2002.
- Gow, A.J.; Farkouh, C.R.; Munson, D.A.; Posencheg, M.A.; Ischiropoulos, H. Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 287(2):L262-268, 1994.
- Green, L.C.; Wagner, D.A.; Glogowski, J.; Skipper, P.L.; Wish-Nok, J.S.; Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, 126:131-138, 1982.
- Hampl, V.; Walters, C.L.; Archer, S.L. Determination of nitric oxide by the chemiluminescence reaction with ozone. In: Feelisch, M.; Stamler, J. S., eds. *Methods in Nitric Oxide Research*. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd., 1996. pp. 309-319.
- Hess, D.T.; Matsumoto, A.; Nudelman, R.; Stamler, J.S. S-nitrosylation: spectrum and specificity. *Nat. Cell Biol.*, 3:E46-E49, 2001.
- Jaffrey, S.R.; Snyder, S.H. The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci. STKE*, (86):PL1, 2001.
- Jaffrey, S.R.; Erdjument-Bromage, H.; Ferris, C.D.; Tempst, P.; Snyder, S.H. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat. Cell Biol.*, 3:193-197, 2001.
- Mannick, J.B.; Hausladen, A.; Liu, L.; Hess, D.T.; Zeng, M.; Miao, Q.X.; Kane, L.S.; Gow, A.J.; Stamler, J.S. Fas-induced caspase denitrosylation. *Science*, 284:651-654, 1999.
- Mannick, J.B.; Schonhoff, C.M. NO means no and yes: regulation of cell signaling by protein nitrosylation. *Free Radic. Res.*, 38(1):1-7, 2004.
- Mannick, J.B.; Schonhoff, C.M. Analysis of protein S-nitrosylation In: *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, Inc., 2004. pp. 14.6.1-14.6.20.
- Park, J.K.; Kostka, P. Fluorometric detection of biological S-nitrosothiols. *Anal. Biochem.*, 249(1):61-66, 1997.
- Park, H.S.; Huh, S.H.; Kim, M.S.; Lee, S.H.; Choi, E.J. Nitric oxide negatively regulates c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase by means of S-nitrosylation. *PNAS*, 97:14382-14387, 2000.
- Ruiz, F.; Corrales, F.J.; Miqueo, C.; Mato, J.M. Nitric oxide inactivates rat hepatic methionine adenosyltransferase in vivo by S-nitrosylation. *Hepatology*, 28:1051-1057, 1998.
- Samouilov, A.; Zweier, J.L. Development of chemiluminescence-based methods for specific quantitation of nitrosylated thiols. *Anal. Biochem.*, 258:322-330, 1998.
- Saville, B. A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analytic*, 83:670-672, 1958.
- Scharfstein, J.S.; Keaney Jr., J.F.; Slivka, A.; Welch, G.N.; Vita, J.A.; Stamler, J.S.; Loscalzo, J. In vivo transfer of nitric oxide between a plasma protein-bound reservoir and low molecular weight thiols. *J. Clin. Invest.*, 94:1432-1439, 1994.
- Stamler, J.S.; Jaraki, O.; Osborne, J.; Simon, D.I.; Keaney, J.; Vita, J.; Singel, D.; Valeri, C.R.; Loscalzo, J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *PNAS*, 89:7674-7677, 1992.
- Stamler, J.S.; Loscalzo, J. Capillary zone electrophoretic detection of biological thiols and their S-nitrosated derivatives. *Anal. Chem.*, 64:779-785, 1992.
- Tsikas, D.; Gutzki, F.M.; Rossa, S.; Bauer, H.; Neumann, C.; Dockendorff, K.; Sandmann, J.; Frolich, J.C. Measurement of nitrite and nitrate in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry and by the Griess assay: problems with the Griess assay – solutions by

- gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 244:208-220, 1997.
- Wink, D.A.; Miranda, K.M.; Feelisch, M.; Mitchell, J.B.; Grisham, M.B.; Fukuto, J.; Feelisch, M. The chemical biology of nitric oxide. Balancing nitric oxide with oxidative and nitrosative stress. In: Mayer, B., ed., *Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 2000. pp. 7-29

33. Análise de Fosfopeptídeos e Fosfoaminoácidos em Cromatografia de Camada Delgada (TLC)

Lúcia Rossetti Lopes

O mapeamento de peptídeos permite ao investigador estudar a fosforilação de uma proteína de interesse na célula. Pode ser utilizado para a determinação do número de sítios de fosforilação em uma proteína, a estoquiometria de fosforilação de determinados sítios e para deduzir a identidade das possíveis cinases envolvidas. Adicionalmente, o estudo comparativo de mapas de peptídeos permite a identificação de quantidades mínimas de fosfoproteínas.

No mapeamento de proteínas em duas dimensões (2D) a proteína de interesse é marcada com [^{32}P] e digerida com proteases ou reagentes químicos. Os peptídeos resultantes são separados em duas dimensões em placas de cromatografia de camada delgada por eletroforese (primeira dimensão) seguida de cromatografia (segunda dimensão). Os peptídeos radiativos são então visualizados por exposição da membrana em um filme de reflexão para visualização dos resíduos fosforilados.

Esta técnica é vantajosa por ser extremamente sensível (funciona com poucas centenas de desintegrações por minuto de proteína marcada). Peptídeos podem ser isolados da camada de celulose e utilizados para a determinação de aminoácidos. É, portanto, um sequenciamento aminoterminal.

Marcando Proteínas *In Vivo* e *In Vitro*

A técnica de análise de peptídeos depende da visualização dos fosfopeptídeos ou fosfoaminoácidos gerados por autorradiografia. O uso de [^{32}P] ortofosfato permite a análise de quantidades muito pequenas de proteínas. As proteínas podem ser marcadas *in vivo* por meio da incubação das células com [^{32}P] ortofosfato ou incubando-se com a proteína cinase e na presença de γ -[^{32}P]-ATP. Para a marcação *in vivo*, as células podem ser incubadas com 2 mCi [^{32}P] por mL em meio sem fosfato. A remoção do fosfato da amostra pode ser obtida por meio de diálise em tampão salina-Tris. Nor-

malmente, 4 horas de incubação com fosfato radiativo é suficiente para marcar as amostras. Após a marcação, as células são lavadas com Tris ou tampão fosfato gelado, para a remoção de [^{32}P] ortofosfato residual. As células são então lisadas em tampão a 4°C. A proteína pode ser purificada por imunoprecipitação ou SDS-PAGE.

Deve-se lembrar que grandes quantidades de [^{32}P] ortofosfato são utilizadas neste estudo para marcar as proteínas e que, portanto, deve-se proteger o pesquisador adequadamente da radiação resultante.

Para o estudo de fatores de crescimento ou ativadores de proteína cinase na fosforilação de proteínas, as células são mantidas em meio com baixas concentrações de soro (0,1-1%) e estes fatores são adicionados no final da incubação com ortofosfato radiativo.

Digestão de Proteínas Marcadas com Fosfato Radiativo Precipitadas com Ácido Tricloroacético

Antes do mapeamento de proteínas, estas geralmente foram submetidas a um SDS-PAGE. Podem ser usadas duas estratégias para recuperar a proteína do gel. A proteína pode ser eluída do gel e precipitada com ácido tricloroacético (TCA) ou acetona e oxidada antes da digestão (protocolo 1, exemplo 1). Uma outra alternativa é transferir por eletroforese as proteínas oxidadas para uma membrana (celulose, náilon e membrana hidrofóbica de difluoreto de polivinilideno, PVDF) e então submetê-las à digestão enquanto estiverem ligadas à membrana (protocolos 4 e 5, exemplo 2). A digestão de proteínas utilizando este método é rápida e as perdas são mínimas. É preciso analisar a solubilidade da sua amostra, visto que a recuperação de proteínas hidrofóbicas será muito pequena. Porém, como estas proteínas estão fosforiladas, a mobilidade provocada pela adição do fosfato torna possível sua análise por este último método.

Eluição das Proteínas do Gel de Poliacrilamida

Após a eletroforese, o gel deve ser seco (protocolo 1). O gel também pode ser corado e fixado. A proteína deve ser localizada por autorradiografia, e em seguida o pedaço de gel correspondente é macerado com tampão de bicarbonato contendo sulfato de sódio dodecila (SDS). A proteína é então eluída em duas etapas, de aproximadamente 90 minutos de duração. Uma destas etapas pode ser feita *overnight* (16 horas).

Os eluatos são então centrifugados para eliminação de resíduos de gel e outras impurezas, em seguida as proteínas são precipitadas com ácido tricloroacético (TCA). A adição de RNase elimina ácido ribonucleico (RNA) contaminante. Pode-se também precipitar as proteínas com 4 volumes de acetona conservada a -20°C . A proteína é obtida por meio da precipitação do eluato por TCA e não por liofilização devido à presença de SDS no eluato. Este SDS é removido durante a precipitação. O sedimento obtido na precipitação por TCA é normalmente pouco visível. A amostra é então lavada com etanol e a proteína precipitada, aparece como um pontinho branco. Esta proteína pode ser digerida ou hidrolisada.

Protocolo 1: Eluição de Proteínas de SDS-PAGE Géis

1. Separação das proteínas por SDS-PAGE, secagem do gel. Marcar as bordas do gel com uma caneta fluorescente.
2. Expor o gel a um filme de raios X, alinhando os marcadores do gel com sua respectiva imagem no filme. Grampear o gel com o filme.
3. Identificar e cortar as bandas de proteína com uma lâmina.
4. Reidratar o gel utilizando 400 μL de tampão a 50 mmol/L de bicarbonato de amônia de pH = 7,3-7,6 por 5 minutos à temperatura ambiente.
5. Triturar o gel até que seus pedaços possam passar por uma ponteira de 200 μL . Transferir os pedaços de gel para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e lavar com uma solução a 50 mM de bicarbonato de amônia. Adicionar 40 μL de β -mercaptoetanol e 8 μL de uma solução a 10 % (p/v) de SDS, ferver por 2-3 minutos, e incubar por pelo menos 90 minutos a temperatura ambiente ou a 37°C sob agitação.

6. Centrifugar por 2-3 minutos a 10.000 rpm em uma microcentrífuga à temperatura ambiente e transferir o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL. Adicionar 400 μL de bicarbonato de amônia a 50 mM contendo 4 μL de SDS 10% e 20 μL de β -mercaptoetanol ao sedimento, agitar e incubar novamente por pelo menos 90 minutos.
7. Centrifugar por 2-3 minutos a 10.000 rpm em uma microcentrífuga à temperatura ambiente, remover o sobrenadante e combinar os dois eluatos. Centrifugar os dois eluatos 5-10 minutos a 10.000 rpm à temperatura ambiente em uma microcentrífuga e transferir o sobrenadante para um novo tubo.
8. Colocar o eluato no gelo e adicionar 20 μg de albumina sérica bovina (BSA) para remover qualquer resíduo de proteína contaminante, misturar bem e adicionar 250 μL de ácido tricloroacético a 100%, misturar bem e incubar por 1 hora no gelo. Centrifugar por 15 minutos em uma microcentrífuga a 4°C e remover o sobrenadante. Centrifugar por 30-60 segundos em uma microcentrífuga e remover os resíduos de TCA restantes. Adicionar 500 μL de etanol a 96%, agitar e centrifugar por 5 minutos a 10.000 rpm a 4°C . Remover o sobrenadante e deixar secar (não liofilizar).

Oxidação com Ácido Perfórmico

Os resíduos de metionina e cisteína podem apresentar-se oxidados ou reduzidos, o que pode afetar a migração dos peptídeos na placa cromatográfica. Assim, as amostras utilizadas na análise do peptídeo devem ser inicialmente oxidadas para prevenir a formação de peptídeos oxidados e/ou reduzidos. No caso de proteínas precipitadas com TCA, o precipitado é dissolvido diretamente em ácido perfórmico gelado e incubado por 1 hora no gelo (protocolo 2). O ácido perfórmico é então diluído com água e evaporado em centrífuga com sistema de vácuo. Após a evaporação, a amostra parece uma bolinha de algodão.

Protocolo 2: Oxidação com Ácido Perfórmico

1. Misturar 9 partes de ácido fórmico (98-100%) com uma parte de peróxido de hidrogênio. Incubar por 60 minutos à temperatura ambiente para permitir a formação do ácido perfórmico.
2. Colocar o tubo no gelo e deixar o ácido perfórmico esfriar.
3. Adicionar em um microtubo 50 μL de ácido perfórmico gelado à amostra de proteína precipitada com

TCA e lavada com etanol ou a mistura de proteínas após estarem secas (protocolo 5). Agitar para dissolver e incubar por 60 minutos no gelo.

4. Adicionar 400 μL de água deionizada, misturar e congelar em gelo seco.
5. Evaporar o ácido perfórmico em centrífuga com sistema de vácuo.

Digestão Proteolítica de Fosfoproteínas em Solução

Para se obter um mapa característico (perfil eletroforético), a fosfoproteína é digerida com proteases específicas que clivam a proteína em determinados resíduos ou sequências. Geralmente, usa-se tripsina ou quimotripsina. Tripsina cliva proteínas na porção C-terminal de resíduos de arginina ou lisina. Quimotripsina cliva a porção C-terminal de resíduos de fenilalanina, tirosina, triptofano mas, não quando seguido de fosfotirosina. Estas enzimas têm sido utilizadas na digestão de proteínas e apresentam boa especificidade. Produtos de digestão parcial podem ser gerados com tripsina quando resíduos adjacentes de arginina e lisina estiverem presentes. Além disso, tripsina não hidrolisa eficientemente as ligações entre arginina/lisina, ácido aspártico/ácido glutâmico e não hidrolisa ligações prolina/arginina/lisina.

Existem outras enzimas disponíveis que não produzem digestão completa, mas podem produzir mapas reproduzíveis. Estas enzimas tem sido utilizadas para digestão secundária ou para a digestão de peptídeos isolados (Tabela 33.1).

Tripsina e quimotripsina podem ser dissolvidas em solução de HCl a 0,1 mmol/L, o que previne a auto-digestão. Também podem ser dissolvidas em água deionizada a 1 mg/mL. As alíquotas são então armazenadas em volumes de 100-200 μL . Para a digestão proteolítica com tripsina ou quimotripsina, as amostras de proteínas precipitadas com TCA são ressuspensas em 50 μL de bicarbonato de amônia a 50 mmol/L, pH 8,0-8,3. De acordo com o protocolo a seguir.

Protocolo 3: Digestão de Fosfoproteínas Precipitadas por TCA

1. Dissolver o sedimento de proteína em 50 μL de bicarbonato de amônia, pH = 8-8,3. Adicionar 10 μg TPCK-tripsina (n-tosyl-L-fenilalanina clorometil acetona, 10 μL de uma solução a 1 mg/mL) para inativar a quimotripsina.
2. Incubar por 3-4 horas a 37°C.
3. Adicionar de novo 3-4 μg de tripsina e incubar por mais 3-4 horas a 37°C.

Tabela 33.1 – Condições para a digestão química e enzimática de fosfoproteínas.

Carboxipeptidase	50 mmol/ NH_4CO_3 , pH 8,0, 37°C
α -Quimotripsina	50 mmol/ NH_4CO_3 , pH 8,0, 37°C
Endoproteinase Asp-N	50 mmol/ NH_4CO_3 , pH 7,6, 37°C
Endoproteinase Glu-C (V8)	50 mmol/ NH_4CO_3 , pH 7,6, 37°C
Endopeptidase específica para prolina	50 mmol/ NH_4CO_3 , pH 7,6, 37°C
Termolisina	50 mmol/ NH_4CO_3 , pH 8,0, 37°C 1 mmol CaCl_2 , 55°C
Tripsina	50 mmol/ NH_4CO_3 , pH 8,0, 37°C
Brometo de cianogênio	50 mg/mL em ácido fórmico, 90 min a 21°C
Hidroxilamina	2 mol/L guanidina, 2 mol/L hidroxilamina, 0,2 mol/L K_2CO_3 pH 9, 4 h, 45°C
Ácido fórmico por 24-48 h, a 37°C	50 mmol/ NH_4CO_3 , pH 8,0, 37°C

4. Adicionar 400 μL de água e liofilizar em uma centrífuga com sistema de vácuo.
5. Dissolver o sedimento em 400 μL de tampão pH 1,9 ou 4,72 (para eletroforese em pH 1,9 ou 4,72) ou água deionizada (para eletroforese em pH 8,9). Centrifugar por 5 minutos a 10.000 rpm em uma microcentrífuga, transferir o sobrenadante e liofilizar. É muito importante que não reste nenhuma partícula neste sobrenadante final.
6. Dissolver o sedimento em 6-10 μL de tampão para eletroforese (pH 1,9 ou 4,72) ou água deionizada (para eletroforese em pH 8,9). Centrifugar rapidamente a 10.000 rpm em uma microcentrífuga e pinçar as amostras na placa de TLC.

Digestão Química e Proteolítica de Proteínas Imobilizadas

Nos protocolos acima descrevemos os métodos convencionais para preparação de amostras para a análise de peptídeo no qual estas são eluídas em um gel de poliacrilamida e em seguida precipitadas com TCA. A desvantagem deste método é que, além de trabalhoso, pode resultar em perda da radiatividade da amostra. Assim, um método alternativo é a transferência das proteínas de interesse para uma membrana (PVDF ou nitrocelulose) após a separação por SDS/PAGE. Os peptídeos então são eluídos da membrana durante a digestão química ou proteólise.

Análise de Peptídeos Digeridos por Tripsina a partir de Proteínas Imobilizadas

Após a separação por eletroforese as proteínas são transferidas para uma membrana que pode ser de nitrocelulose, PVDF ou *Immobilon-P*. A proteólise por tripsina pode ser realizada em qualquer membrana, porém a mais utilizada é a de nitrocelulose. Esta membrana não deve ser utilizada quando se pretende fazer uma análise dos aminoácidos fosforilados. Neste caso, deve-se utilizar membrana de PVDF ou *Immobilon-P*. Após a transferência, a membrana deve ser embrulhada em papel de plástico para evitar seu ressecamento durante a autorradiografia. O ressecamento pode resultar na eluição ineficiente do material presente na membrana.

Antes da digestão proteolítica, trata-se a membrana com poli (vinilpirrolidona) ou ainda PVP para bloquear sítios não específicos da tripsina durante a digestão (protocolo 4). A membrana é então cortada em pedaços

de 3×8 mm que podem ser incubados com 200 μL de tampão. Os peptídeos são eluídos da membrana durante a digestão com tripsina e em seguida são liofilizados. A oxidação com ácido per fórmico deve ser realizada após a digestão com tripsina e eluição dos fosfoptídeos da membrana. As membranas de nitrocelulose e náilon dissolvem em ácidos fortes.

Protocolo 4: Digestão Proteolítica de Proteínas Imobilizadas

1. Colocar os pedaços de membrana contendo a proteína de interesse em PVP a 0,5% diluído em 100 mM (0,57 mL/100mL) de ácido acético por 30 minutos a 37°C em um tubo de microcentrífuga.
2. Aspirar o líquido. Lavar cinco vezes com água ultrapura e em seguida com 50 mM de bicarbonato de amônia preparado na hora.
3. Incubar os pedaços de membrana com 10 μg de TPCK-tripsina por 2 horas em 200 μL de 50 mM a 37°C. Os pedaços de membrana devem ficar completamente submersos.
4. Agitar utilizando um vórtice, adicionar 10 μg de TPCK-tripsina e incubar a 37°C por mais 2 horas ou *overnight* (16 horas).
5. Adicionar 300 μL de água e centrifugar a 10.000 rpm em uma microcentrífuga por 5 minutos à temperatura ambiente.
6. Transferir o líquido para um novo tubo. Contar a radiatividade no líquido, aproximadamente 90% da radiatividade inicial da membrana deve estar presente no líquido.
7. Liofilizar a amostra em uma centrífuga com sistema de vácuo, vá adicionando 10 μL de água para não deixar secar completamente (demora de 3-4 horas para secar).
8. Se necessário, os peptídeos podem ser oxidados com ácido per fórmico, conforme descrito (protocolo 2).
9. Após a oxidação, adicionar 400 μL de água, congelar e liofilizar. Dissolver a amostra em 6-10 μL de tampão para eletroforese (protocolo 3, item 7) e aplicar a amostra na placa de TLC.

Protocolo 5: Clivagem de Proteínas Imobilizadas com CNBr (Brometo de Cianógeno)

A clivagem por CNBr é um método muito útil para estudar os sítios de fosforilação. CNBr reage especifica-

mente com resíduos de metionina e provoca a clivagem das ligações peptídicas na porção carboxiterminal da proteína em pH ácido (pH 3,0). Como a metionina não é um aminoácido abundante em proteínas, os fragmentos gerados por CNBr são geralmente grandes e podem ser analisados por SDS-PAGE (2D). A quebra por CNBr pode ser realizada em proteínas eluídas a partir de um gel (protocolo 1) ou imobilizada em membrana (protocolo 4). Membranas de náilon ou *Immobilon-P* não devem ser utilizadas neste procedimento. O náilon dissolve-se em ácido fórmico e nenhuma radiatividade pode ser recuperada de proteínas ligadas às membranas *Immobilon-P* que foram clivadas com CNBr.

O método consiste na incubação dos pedaços de membrana com CNBr em ácido fórmico a 70% (protocolo 6). Deve ser utilizada solução suficiente para cobrir completamente a membrana. A incubação com 200 μ L para pedaços de membrana de 3x8 mm é o ideal. O CNBr é extremamente tóxico e deve ser manuseado em capela. Durante a digestão, os peptídeos entram na solução e o CNBr e ácido fórmico são removidos através da liofilização das amostras. Esta última etapa é muito importante, pois a presença de resíduos de ácido fórmico na amostra interfere na análise por SDS-PAGE. Se o azul de bromofenol presente no tampão de amostra tornar-se amarelo, existe ainda o ácido fórmico na amostra. Pode-se adicionar Tris-base (pH 9,0) concentrado para aumentar o pH. Peptídeos pequenos podem ser visualizados em SDS-PAGE géis a 24%.

Método

1. Fazer uma solução de CNBr a 50 mg/mL em ácido fórmico. Preparar uma solução-estoque de 300 mg/mL adicionando ácido fórmico diretamente no frasco que contém CNBr. Esta solução-estoque pode ser armazenada em alíquotas a -70°C e diluída em ácido fórmico a 70% no início do experimento.
2. Tampão de eletroforese (755 mg Tris-base, 10 mL de glicerol, dissolver em 35 mL de água, ajustar o pH para 6,8 com uma solução 6 M de HCl. Adicionar 2 g de SDS, 5 mL de 2-mercaptoetanol, 1 mg de azul de bromofenol, q.s.p. para 100 mL com água ultrapura.
3. Para a visualização de peptídeos de baixo peso molecular, utilizar o tampão de tricina (0,1 M N-tris [hidroximetil]metilglicina, 0,1% de SDS (p/v) 0,1 M de Tris-base, pH 8,25).
4. Incubar os pedaços de membrana contendo a proteína de interesse (protocolo 4) com 50 mg/mL de CNBr em ácido fórmico a 70 % por 1-1,5 horas à temperatura ambiente em um tubo de microcentrifuga fechado.
5. Centrifugar as amostras em uma microcentrifuga a 10.000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente.
6. Transferir o líquido para um novo tubo.
7. Liofilizar a amostra. Demora aproximadamente 30 minutos para secar 200 μ L de ácido fórmico a 70%.
8. Dissolver a amostra em 30-40 μ L de água deionizada e liofilizar novamente. Repetir o procedimento.
9. Dissolver os fragmentos de CNBr em tampão de amostra com SDS. Analisar os peptídeos em gel de poliacrilamida 24%, bis-acrilamida a 0,054% utilizando o tampão de tricina.

Separação em Duas Dimensões de Fosfopeptídeos em Placas de TLC

As análises de peptídeo podem ser geradas em placas de cromatografia de camada delgada (TLC). Se a digestão originar peptídeos muito grandes, eles podem ser visualizados por SDS-PAGE. Dessa forma, descreveremos a seguir a análise de fosfopeptídeos em placas de TLC de cromatografia de 2D e eletroforese de 1D.

Escolha do Tampão de Eletroforese

Os produtos da digestão das amostras são separados em primeira dimensão por eletroforese. A mobilidade na eletroforese é determinada pela razão entre a carga e a massa do peptídeo e pode ser calculada pela fórmula:

$$mr = ke M^{-2/3}$$

Onde mr é a mobilidade relativa; k , uma constante; e , carga elétrica; M a massa da molécula.

Existem três tipos diferentes de tampão que podem ser utilizados na primeira dimensão: tampão pH 1,9, pH 4,72, pH 8,9 (Tabela 33.2). Estes tampões são compostos de solventes voláteis que podem ser evaporados completamente após a eletroforese. Basta deixar as placas de TLC secarem à temperatura ambiente. Isto permite que se utilize um tampão completamente diferente na segunda dimensão. Em geral, peptídeos contendo resíduos básicos apresentam melhor resolução em pH ácido. Estes aminoácidos básicos encontram-se na forma protonada e, portanto, possuem carga em pHs mais ácidos e assim apresentam maior mobilidade. Por outro lado, peptídeos contendo resíduos acídicos apresentam carga em pHs mais alcalinos e, portanto, maior mobilidade. No entanto, como a maioria dos fosfopeptídeos contém resíduos ácidos e básicos, as condições ideais de

eletroforese de cada um são determinadas testando-se os tampões citados na tabela 33.2.

Após a escolha do tampão, a separação da proteína de interesse pode ser melhorada com o aumento do tempo de eletroforese. Este procedimento deve ser acompanhado de uma mudança na posição inicial da amostra para evitar que ela saia fora das placas de TLC. Se nenhum dos tampões citados apresentar resultado, o melhor é usar o tampão pH 1,9, pois a maioria dos peptídeos é solúvel neste pH e as análises peptídicas realizadas neste pH apresentam melhor resolução.

Preparação das Amostras para Separação dos Fosfopeptídeos em Duas Dimensões

Materiais

- Tampão de eletroforese (Tabela 33.2). Verificar o pH do tampão antes de iniciar o procedimento, e se variar mais de 0,2 unidades não ajustá-lo. Preparar o tampão novamente.
- Placas de TLC.
- Corante marcador verde (5 mg/mL) de dinitrofinil lisina, 1 mg/mL de xileno de cianol (azul) em água ultrapura.

Método

1. Dissolver as amostras em 100 μ L (aproximadamente 1.000 cpm/ μ L). Agitar para misturar. Separar 20 μ L ou 20.000 cpm para a análise de fosfoaminoácidos.
2. Marcar o ponto inicial (usar um lápis sem ponta) da amostra e do marcador na camada de celulose na placa de TLC (Fig. 33.1).
3. Pingar a amostra na placa de TLC. Aplicar a amostra usando uma micropipeta com uma ponteira capilar. Aplicar 0,5 μ L de cada vez para que o volume onde a amostra foi aplicada fique pequeno e vá acompanhando a radiatividade, até que o contador demonstre (aproximadamente, pingar umas oito vezes). Secar a amostra utilizando um secador entre cada aplicação. Cuidado para não encostar na placa.
4. Aplicar 0,5 μ L de marcador na parte superior da placa. Aplicar novamente até a visualização de um anel colorido (Fig. 33.2). A mistura é verde, mas durante a eletroforese vai-se separar em amarelo mais azul. A cor azul dá uma indicação do progresso da eletroforese, enquanto amarela delimita a posição para a qual os peptídeos neutros devem migrar. Em pH 1,9, a dinitrofenil lisina apresenta-se carregada positivamente.

Tabela 33.2 – Tampões utilizados para análise dos fosfolipídios contendo resíduos ácidos e básicos.

Tampão	Quantidade	Componentes
pH 1,9	50 mL 156 mL 1.794 mL	Ácido fórmico 88 % (p/v) Ácido acético glacial Água deionizada
pH 3,5	100 mL 10 mL 1.890 mL	Ácido acético glacial Piridina* Água deionizada
pH 4,72	100 mL 50 mL 50 mL 1.800 mL	n-Butanol Piridina* Ácido acético glacial Água deionizada
pH 6,5	8 mL 200 mL 1.792 mL	Ácido acético glacial Piridina* Água deionizada
pH 8,9	20 g 2.000 mL	Carbonato de amônio Água deionizada

* Piridina é muito instável e não deve ser utilizada se estiver com uma coloração amarela intensa. Armazenar em nitrogênio líquido. Após o preparo do tampão, colocar no nitrogênio e fechar com filme plástico (*parafilm*).

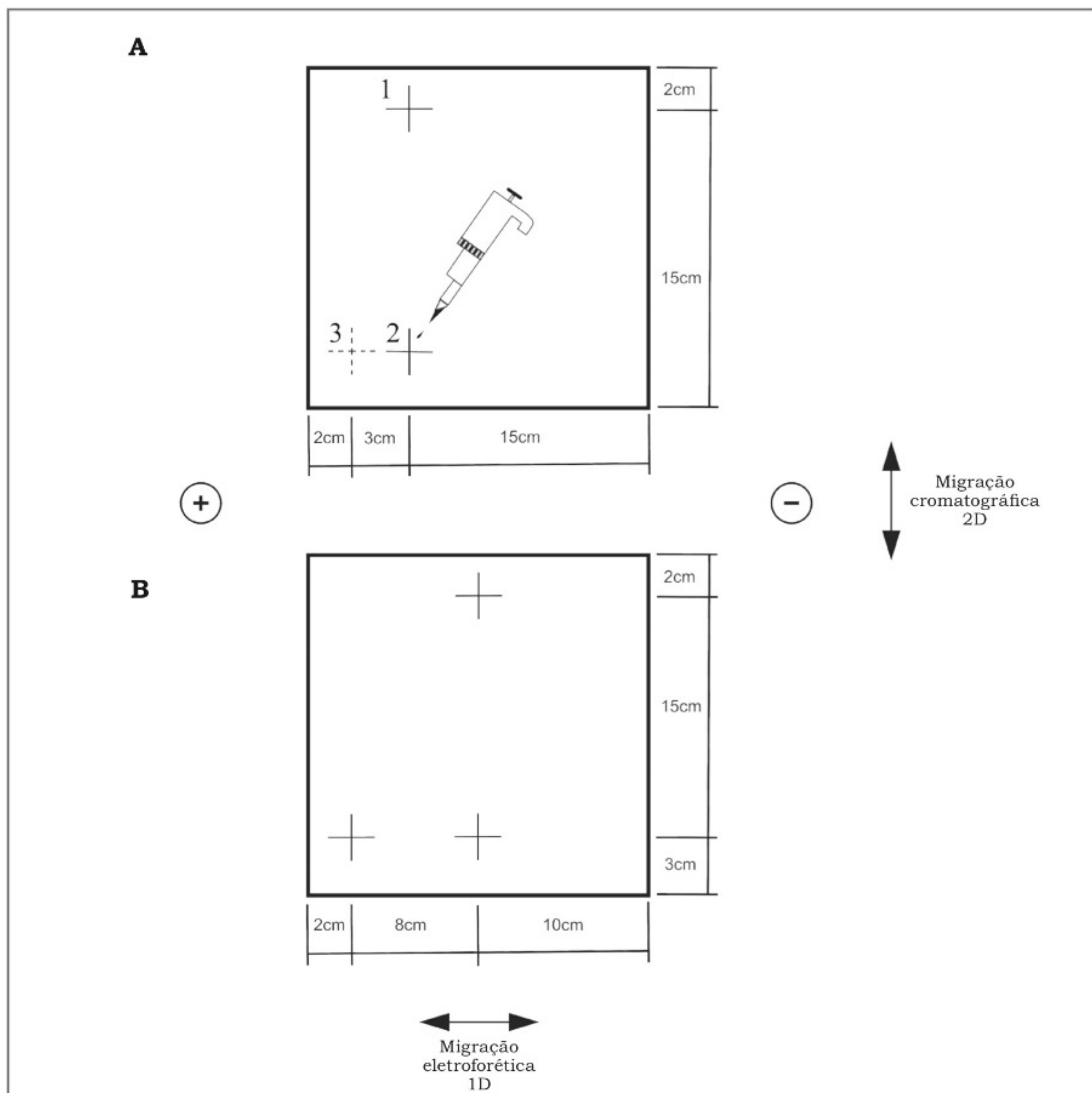


Figura 33.1 – Localização do ponto inicial das amostras e marcadores utilizados na separação em duas dimensões de fosfopeptídeos em placas de TLC (20 X 20 cm). **(A)** Eletroforese em tampão pH 1,9 ou 4,72. **(B)** Eletroforese em pH 8,9.

1- Origem.

2- Origem amostra.

3- Origem marcador.

Eletroforese

Existem diversos sistemas para eletroforese de placas finas disponíveis no mercado. O importante nestes sistemas é que exista uma bomba de refrigeração de água (que deve estar a uma temperatura de 5°C) e uma fonte capaz de fornecer aproximadamente 100 mA e 1,5 kV.

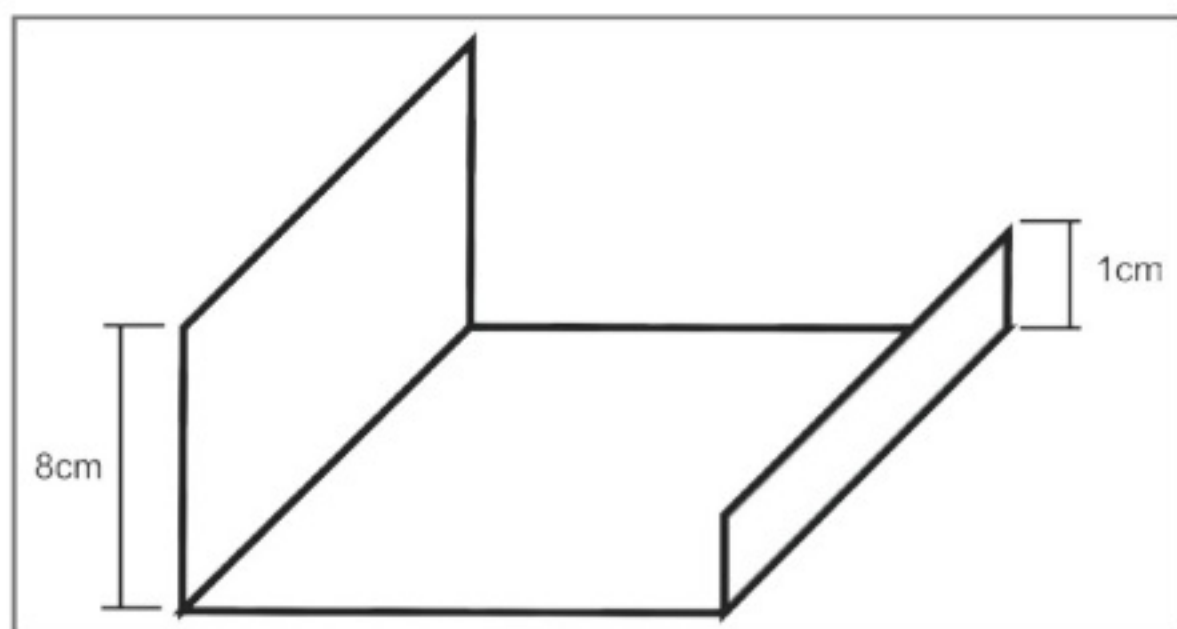
Protocolo 7: Primeira Dimensão – Eletroforese de Placa de Camada Delgada

Materiais

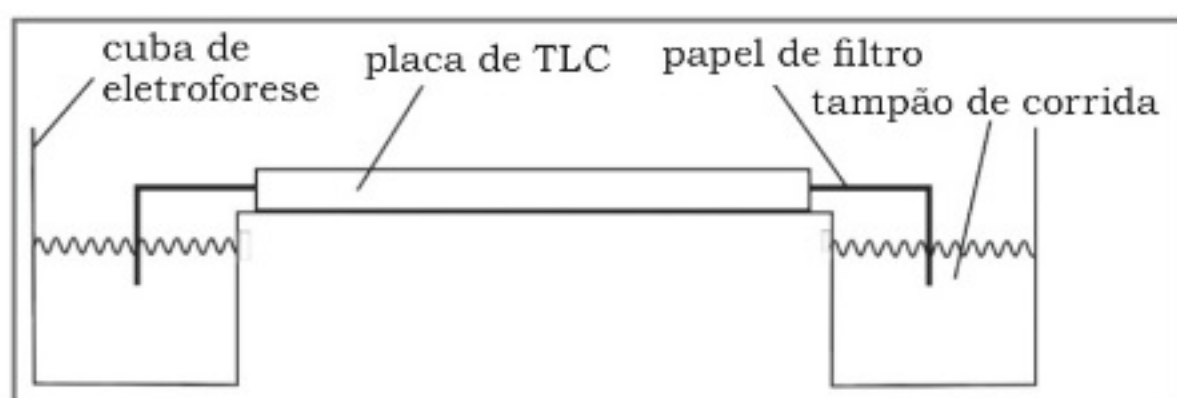
- Tampão de eletroforese (Tabela 33.2).
- Aparato para eletroforese.
- Fonte de corrente.

Método

1. Dobrar duas folhas de papel de filtro, conforme as linhas do desenho abaixo:



2. Encher cada compartimento com aproximadamente 600 mL de tampão de eletroforese. Colocar a folha de papel de filtro com a dobra de 1 cm encostando na placa de celulose e a dobra de 8 cm dentro do tanque, de maneira a fazer uma ponte conectando o tampão à placa de celulose (ver esquema abaixo).



3. Utilizando duas folhas de papel de filtro do mesmo tamanho que a placa de celulose, fazer dois furos (1,5 cm de diâmetro) no local correspondente à posição inicial da amostra e do marcador (Fig. 33.2).
4. Colocar estas folhas de filtro no tampão de eletroforese e remover o excesso de tampão utilizando uma outra folha de papel de filtro.
5. Colocar a placa de TLC no aparato de eletroforese.
6. Colocar as folhas de papel de filtro sobre a placa de TLC e vá pressionando-o contra a placa molhando toda a extensão da placa de TLC. Trabalhar na região dos furos pressionando de fora para dentro para garantir uma concentração uniforme do tampão em toda a extensão da placa e em volta da amostra. Cuidado para não mover lateralmente o papel de filtro quando este estiver em contato com a placa de TLC.
7. Examinar a placa, ela deve estar com uma coloração cinza, não deve haver acúmulo de tampão. O excesso de tampão deve ser removido com um papel de filtro ou por evaporação.
8. Fechar o aparato de eletroforese e ligar a fonte. Geralmente a corrida eletroforética ocorre em tampão de eletroforese pH 1,9 por 45 minutos a 1.000 V. Isto é suficiente para que o marcador (corante) da primeira dimensão desloque-se 4 cm. A temperatura do banho de água deve ser mantida em 5°C.
9. Após a eletroforese, secar as placas de TLC usando um secador.

Separação em Segunda Dimensão por Cromatografia

A separação em segunda dimensão é feita por cromatografia ascendente. A hidrofobicidade dos diferentes peptídeos determina a sua partição (mobilidade) entre a fase móvel e a estacionária. A fase móvel é composta pelo tampão de cromatografia e se move devagar em direção à linha de frente (o topo da placa). A celulose da placa é a fase estacionária. A hidrofobicidade de um peptídeo determina sua migração durante a cromatografia. Um peptídeo hidrofóbico tem maior afinidade pela fase móvel e migrará mais rapidamente em direção à linha de frente. Por outro lado, um peptídeo hidrofílico tem maior afinidade pela fase estacionária e migrará mais lentamente que um peptídeo hidrofóbico.

Os tampões mais comuns para cromatografia utilizados estão ilustrados na tabela 33.3. O tampão de cromatografia geral é utilizado para análise de peptídeos marcados com $[^{35}\text{S}]$ ou $[^{125}\text{I}]$. O tampão de fosfocromatografia

Tabela 33.3 – Composição do tampão de cromatografia.

Tampão	Quantidade (mL)	Componente
Tampão de cromatografia geral	785	n-Butanol
	607	Piridina
	122	Ácido acético glacial
	486	Água deionizada
Tampão de fosfocromatografia	750	n-Butanol
	500	Piridina
	150	Ácido acético glacial
	600	Água deionizada
Ácido isobutírico	1250	Ácido isobutírico
	38	n-Butanol
	96	Piridina
	58	Ácido acético glacial
	558	Água deionizada

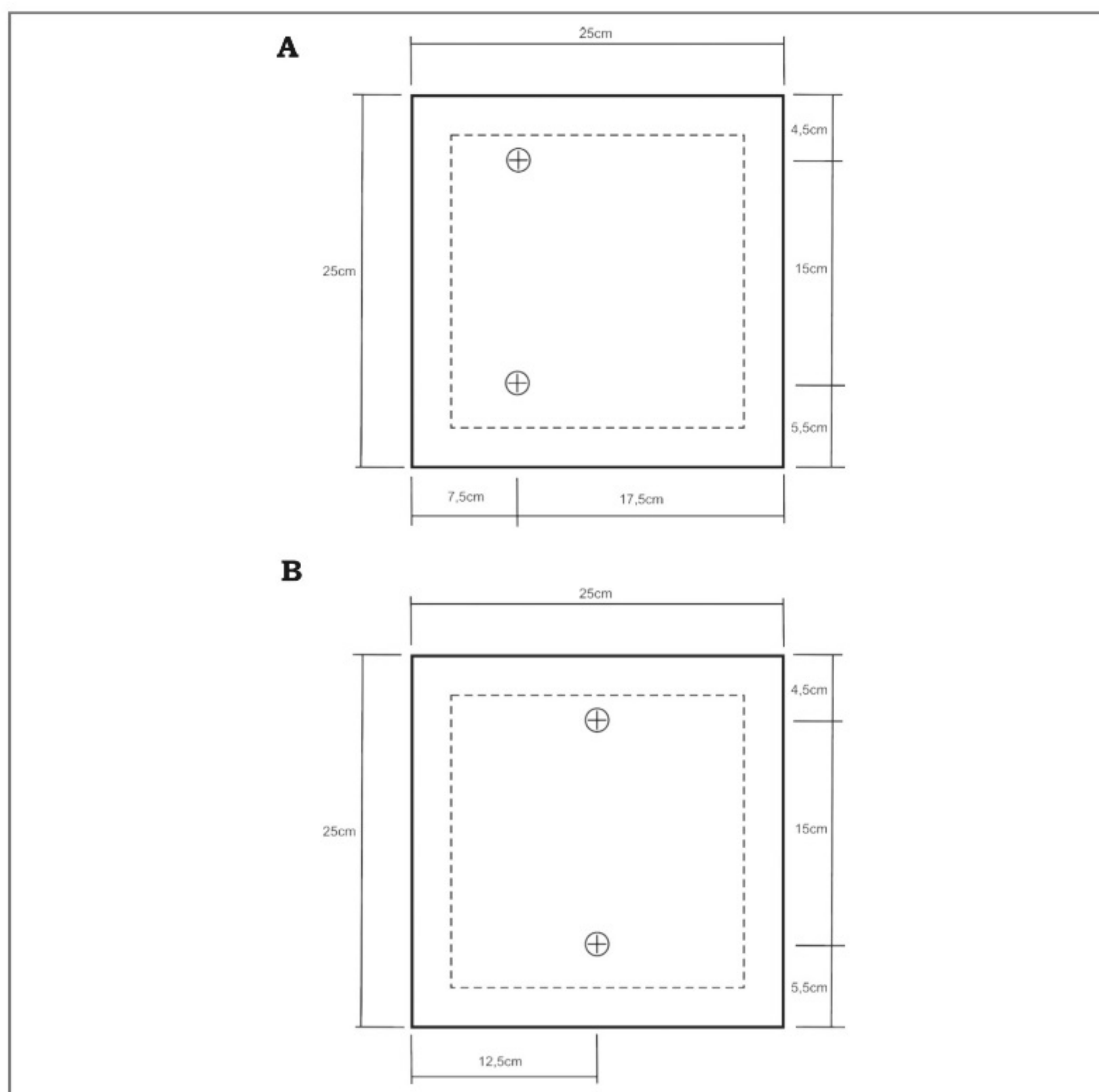


Figura 33.2 – (A) Dimensões dos *blotters* para umedecer as placas de TLC antes da eletroforese em pH 1,9. (B) 2D em pH 3,5.

é uma mistura mais hidrofílica usada para analisar fosfopeptídeos. O tampão de ácido isobutírico é utilizado na análise de fosfopeptídeos extremamente hidrofílicos. A melhor maneira de se determinar o tampão ideal para a sua amostra é fazer experimentos pilotos.

Cálculo feito para 2 litros de cada tampão: fazer o cálculo do volume considerando que o tampão cubra 2 cm a partir do fundo do tanque. Para tanques pequenos, 200 mL são suficientes.

Protocolo 8: Segunda Dimensão – Cromatografia de Camada Delgada

Materiais

- Tampão de cromatografia.
- Tanque de cromatografia (existem diversos tamanhos disponíveis, para 2 ou mais 20 X 20 cm placas de TLC. O tanque deve ser hermeticamente fechado com cera.

Método

1. Pingar uma gota de marcador (aproximadamente 0,5 µL) do marcador verde (marcador de segunda dimensão) (Protocolo 7) na margem direita ou esquerda da placa de TLC (Fig. 33.1).
2. Colocar a placa de TLC seca em uma posição de modo que se veja que o marcador rosa (de primeira dimensão) esteja para cima.
3. Deixar a placa de TLC dentro do tanque, tempo suficiente para que o tampão atinja mais ou menos uma distância de 1 cm do topo da placa. Isto leva geralmente 8-12 horas (melhor fazer esta etapa por *overnight*).
4. Remover a placa e deixar secar em uma capela ou colocar em forno a 65°C. Não se deve utilizar o forno se pretender extrair os peptídeos da placa posteriormente.
5. Expor as placas a um filme de raios X dentro de um cassete apropriado.

Análise de Fosfoaminoácidos

A análise de fosfoaminoácidos é feita inicialmente pela hidrólise da proteína purificada marcada com [³²P] radiativo. Incuba-se a proteína de interesse juntamente com um ácido ou uma base concentrada, o que resulta na hidrólise das ligações peptídicas originando peptídeos e aminoácidos individuais. No entanto, ligações

fosfo-diéster também são rompidas durante a hidrólise, o que provoca a defosforilação de aminoácidos e consequente liberação de fosfato livre. Para se minimizar isto é preciso respeitar o tempo das reações descrito nos protocolos a seguir.

A proteína de interesse pode ser purificada por eletroforese e isolada do gel por precipitação com TCA (protocolo 1). Uma outra alternativa é a transferência das proteínas do gel para uma membrana de *Immobilon P* ou de PVDF e em seguida hidrolisadas na membrana. Não se devem usar membranas de nitrocelulose, pois elas não resistem a hidrólise ácida. Recomenda-se a hidrólise da proteína na membrana, exceto em casos em que a proteína de interesse não transfira bem.

Hidrólise Ácida de Fosfoproteínas Purificadas

Após a transferência, adiciona-se a solução corante vermelho-*Ponceau* (sal trissódico de ácido 1-(4-sulfo-1-naftilazo)-2-naftol-6,84-disulfônio) para localizar a banda contendo a fosfoproteína e corta-se a membrana nesta altura. Após isto, a membrana deve ser lavada diversas vezes com água para a remoção de resíduos de sal e detergente. As proteínas precipitadas com TCA também podem ser hidrolisadas. Após a lavagem com etanol, dissolver as proteínas em 50 µL e hidrolisar 1 hora a 110°C. Remover o ácido clorídrico por evaporação e as amostras estão prontas para serem analisadas.

Fosfoaminoácidos também podem ser obtidos após hidrólise com uma base forte. Este procedimento é recomendado para a análise de fosfotirosina, pois este aminoácido é mais estável em ácido forte do que em base forte. Para isso, deve-se incubar a membrana com hidróxido de potássio (KOH) concentrado. O problema é que este KOH deve ser removido em coluna de cromatografia de troca iônica para possibilitar a análise destas amostras por eletroforese.

Protocolo 9: Hidrólise Ácida de Fosfopeptídeos Ligados à Membrana

1. Colocar o pedaço de membrana em um tubo de microcentrífuga e lavar diversas vezes com água deionizada.
2. Adicionar 200 µL de ácido clorídrico (HCl, 6 M), e deixar em banho fervente rigorosamente por 1 hora. É necessário manter a tampa do tubo fechada e colocar algo em cima para que ela não abra durante o banho fervente, o que resultaria na perda da amostra.

3. Centrifugar 5 minutos a 10.000 rpm em microcentrífuga à temperatura ambiente e transferir o sobrenadante para um novo tubo. Evitar transferir o material sólido precipitado no fundo do tubo.
4. Evaporar o HCl em um concentrador a vácuo (centrífuga com sistema a vácuo).

Separação de Fosfoaminoácidos por Eletroforese em Duas Dimensões

A separação de fosfoaminoácidos pode ser realizada utilizando a técnica de eletroforese em duas dimensões. Fosfotreonina (PThr) e fosfotirosina (PTyr) migram em conjunto durante a eletroforese em pH 1,9 mas separam-se de fosfoserinas (PSer). PThr separa-se bem de PTyr em pH 3,5. Fosfatos, fosfopeptídeos e aminoácidos isolados de amostras purificadas podem ser separados utilizando-se eletroforese em pH 3,5. Este método deve ser utilizado quando se trabalha com proteínas fosforiladas *in vitro*, ou peptídeos purificados nos quais fosfato, fosfopeptídeos e fosfoaminoácidos são os únicos compostos radiativos presentes no lisado. A principal vantagem é que 16 amostras podem ser analisadas de cada vez.

Protocolo 10: Análise de Fosfoaminoácidos por Duas Dimensões

Materiais

- Tampão de pH 1,9 e 3,5 (Tabela 33.2).
- Fosfoaminoácidos-padrão (1 mg/ mL de fosfoserina, 1 mg/ mL de fosfotreonina, 1 mg/ mL de fosfotirosina).
- Solução de ninidrina a 0,25% em acetona.

Método

1. Dissolver as amostras (com auxílio de um vórtice) em 6-10 μ L de tampão pH 1,9 contendo 1 μ g de fosfoaminoácido padrão não marcados. Centrifugar 10-30 segundos para remover partículas.
2. É possível correr quatro amostras de cada vez em uma placa de TLC (Fig. 33.2). Marcar a origem de cada amostra utilizando um lápis sem ponta.
3. Pingar uma gota de marcador verde (protocolo 6) e 0,5 μ L de cada amostra nas marcas correspondentes (Fig. 33.3). São suficientes 50-100 cpm para uma análise reprodutível. Lembrar-se que após hidrólise parcial apenas 20% da radiatividade estará na forma

de aminoácidos, a maioria na forma de fosfatos inorgânicos peptídeos não completamente digeridos.

4. Molhar a placa usando um papel cortado com 5 furos (Fig. 33.4A). Molhar o papel no tampão pH 1,9, remover o excesso e colocar sobre a placa de TLC com os furos sobre as amostras e o marcador.
5. Pressionar em volta de cada orifício para permitir que o tampão entre em contato com as amostras. A placa de TLC deve estar uniformemente molhada.
6. Fazer uma corrida de 800 V por 40 minutos.
7. Remover a placa e secá-la com um secador por aproximadamente 30 minutos.
8. Remover o tampão pH 1,9 e trocar pelo de pH 3,5. Adicionar 0,5 M de EDTA ao tampão pH 3,5. Molhar a placa de TLC com um papel que foi preparado conforme descrito acima e molhado no tampão pH 3,5 (Fig. 33.4B). Quando o papel contendo tampão pH 3,5 for pressionado contra as amostras, pode-se observar uma linha marrom bem fina, na qual as amostras correram.
9. Virar a placa 90°C em relação à primeira dimensão, em direção ao cátodo. Corra por 30 minutos a 800 V.
10. Secar a placa utilizando um forno a 65°C por alguns minutos.
11. Borrifar a solução de ninidrina e aquecer a placa no forno a 65°C por 15 minutos. Você verá manchas roxas que correspondem aos aminoácidos padrão. Esta marcação permanece durante a autorradiografia.
12. Expor a placa de TLC a um filme de raios X a -70°C.

É importante notar que estas condições de corrida apresentadas são suficientes para manter cada amostra no quadrante da placa reservado para elas. Portanto, estas condições precisam ser padronizadas de acordo com o tipo de equipamento de eletroforese utilizado.

Análise Criteriosa dos Fosfoaminoácidos Obtidos

A análise do fosfopeptídeo é uma técnica que possibilita estimar o número de sítios de fosforilação de determinada proteína, desde que todos os sítios sejam clivados durante a digestão com tripsina. A comparação de células cultivadas em meios diferentes permite a análise do efeito do meio sobre a fosforilação de determinada proteína. A partir deste estudo, pode-se correlacionar a fosforilação de determinada proteína com sua estabilidade ou atividade enzimática. A análise de peptídeo também é útil para investigar se a fosforilação

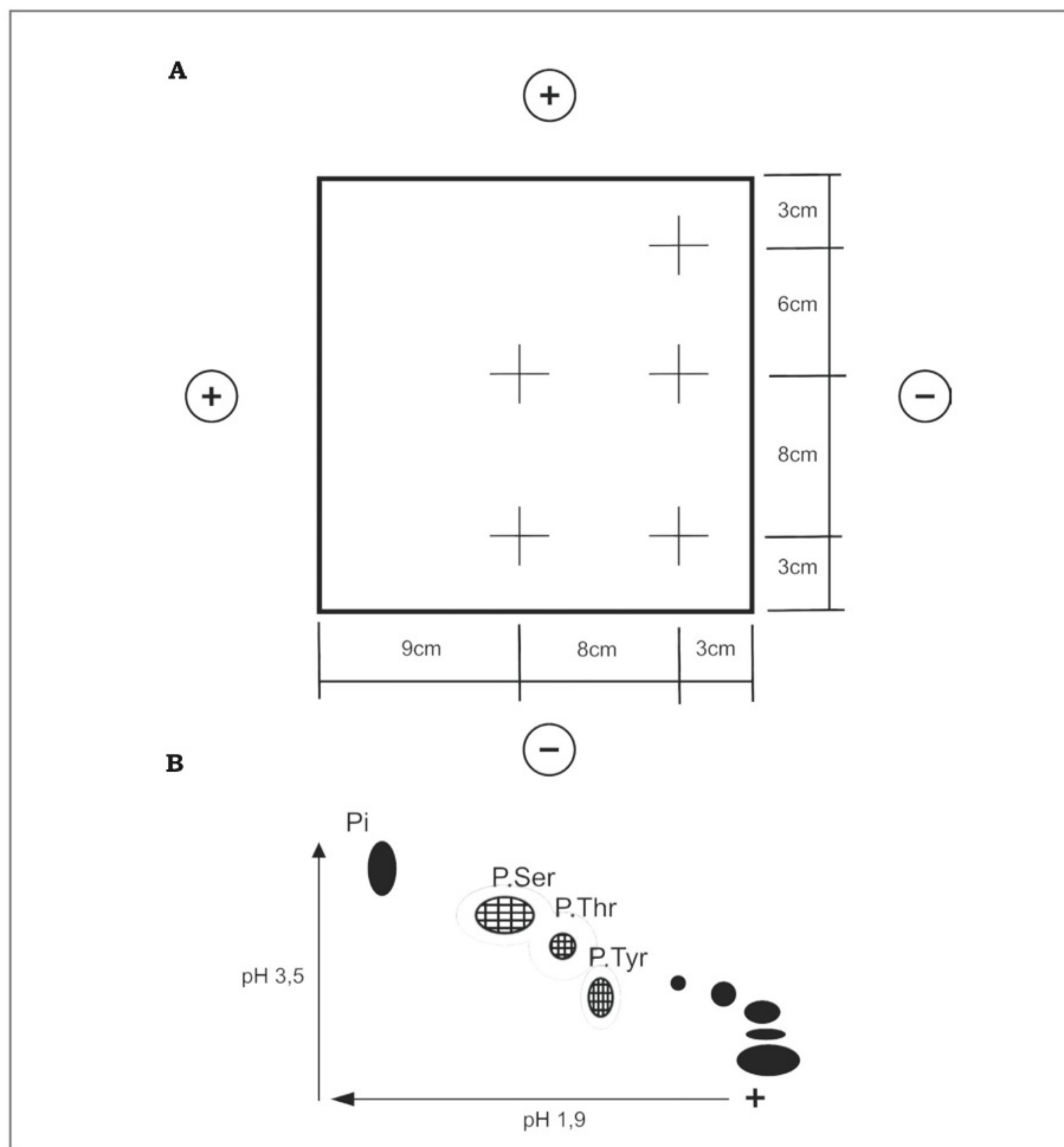


Figura 33.3 – (A) Localização da origem das amostras e do ponto de origem para a eletroforese em 2D de fosfoaminoácidos em placa de TLC (20 × 20cm). **(B)** Posição dos aminoácidos individuais após eletroforese em 2D, aproximadamente 20% da radiatividade migra como fosfoserina (PSer), fosfotreonina (PThr) ou fosfotirosina (PTyr). O restante é apresentado como fosfato inorgânico (Pi) ou produtos de digestão parcial (parciais).

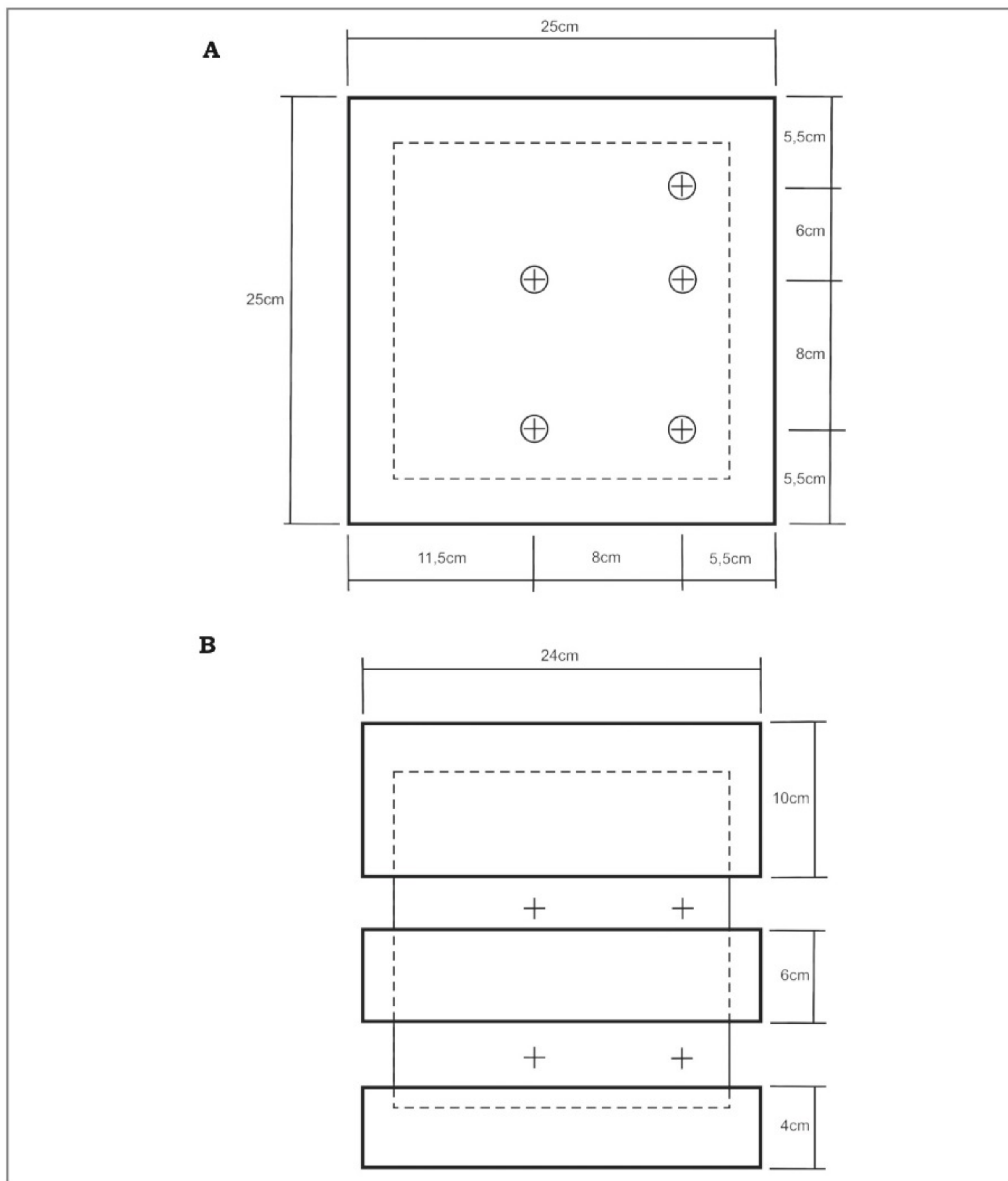


Figura 33.4 – (A) Dimensões dos *blotters* para umedecer as placas de TLC antes da separação de fosfoaminoácidos por eletroforese na primeira dimensão em pH 1,9. (B) Segunda dimensão em pH 3,5.

de uma proteína por determinada cinase purificada pode envolver sítios que normalmente são fosforilados *in vivo*. Porém, a identificação da sequência deste sítio de fosforilação exige uma investigação mais detalhada.

Isolamento dos Fosfopetídeos da Placa de TLC

Os fosfopetídeos obtidos podem ser isolados na placa de TLC para análise mais detalhada. Após a autorradiografia, deve-se colocar o filme sobre a placa de TLC e os locais das amostras que correspondem à radiatividade obtida no filme. Pode-se usar uma lâmina ou espátula para raspar a celulose contendo a amostra previamente identificada pela autorradiografia. Os fosfopetídeos são então cluídos em tampão com pH 1,9 (Tabela 33.2). Os peptídeos muito hidrofóbicos podem ser diluídos em tampão de cromatografia. Os eluatos são centrifugados para a remoção das partículas de celulose. Os sobrenadantes são, então, liofilizados.

Protocolo 11: Isolamento de Fosfopetídeos das Placas de TLC

1. Alinhar a placa de TLC com o filme de raios X e marcar com caneta fluorescente a posição dos fosfopetídeos na placa de TLC.
2. Cortar uma ponteira e inserir um disco de polietileno (6,5 mm) até que ele esteja firme.
3. Anexar a ponteira a uma linha de vácuo e utilizando sua ponta raspar a nitrocelulose do local onde está o fosfopetídeo. Os resíduos de nitrocelulose contendo o fosfopetídeo serão removidos da placa, sugados pelo vácuo e estarão aderidos ao papel de filtro.
4. Remover a ponteira e colocá-la na posição invertida dentro de um tubo de microcentrífuga. Adicionar 100 μ L de um tampão pH 1,9 dentro da ponteira e deixar à temperatura ambiente por 5 minutos. Centrifugue a 2000 rpm por 5-10 segundos a temperatura ambiente. Cuidado para que a ponteira não encoste na tampa. Repita este procedimento usando tampão pH = 1,9 e duas vezes usando água deionizada. Colete os eluatos de cada centrifugação no mesmo tubo.
5. Centrifugar os eluatos combinados por 5 minutos a 10.000 rpm (temperatura ambiente) em uma microcentrífuga e transferir o sobrenadante obtido para um novo tubo. Liofilizar este sobrenadante.
6. Contar a radiatividade na celulose e no eluato. Se a contagem for baixa, repetir o processo todo utili-

zando um tampão de eletroforese diferente ou um tampão de cromatografia (Tabelas 33.2 e 33.3).

A identificação de determinado sítio de fosforilação pode ser obtida pelo procedimento a seguir. Com base na sequência de DNA, fazer uma lista dos possíveis candidatos a peptídeos que serão gerados pela digestão com a tripsina. Listar as propriedades destes peptídeos, considerando a suscetibilidade para a digestão por proteases, a presença de sítios aceptores de fosfato e a presença de cisteínas e metioninas. A presença de cisteínas e metioninas pode ser determinada por uma dupla marcação com ^{35}S e ^{32}P , seguida da análise de peptídeo. Expor os mapas inicialmente a uma leitura de ^{32}P usando uma tela de intensificação para ^{32}P e papel-alumínio bloqueando a baixa energia gerada pelo ^{35}S . Após um período suficiente para o decaimento da radiação emitida pelo ^{32}P , os mapas são então expostos ao filme de raios X novamente para visualização da radiação ^{35}S . Alinhando-se os dois filmes obtidos nas duas exposições na placa de TLC, e sabendo-se que o primeiro aminoácido de uma proteína é sempre uma metionina, podem-se obter os possíveis sítios de fosforilação da proteína analisada. Este procedimento só é possível se a proteína em questão for muito fosforilada. Uma outra forma de se analisar os possíveis sítios de fosforilação de uma proteína é fazer uma mutação na sequência do DNA correspondente a um aminoácido desta proteína, transfectar este DNA mutante em uma linhagem de células e observar a alteração na análise dos aminoácidos da proteína em questão. Uma última forma de análise dos sítios de fosforilação de uma proteína consiste em eluir os pontos da placa de TLC e injetá-los no espectrofotômetro de massa para identificação dos sítios de fosforilação.

Referências

- Andrews, A.T. Peptide mapping. In: Hames, B.D. Gel Electrophoresis of Proteins: The practical Approach Series. Oxford University Press. 3rd ed. Cap. 7. 1998, p. 213-235.
- Lopes, L.R.; Dagher, M.C.; Gutierrez, A.; Young, B.; Bouin, A.P.; Fuchs, A.; Babior B.M. Phosphorylated p40PHOX as a negative regulator of NADPH oxidase. Department of Molecular and Experimental Medicine, The Scripps Research Institute, La Jolla, California 92037, USA.
- El Benna, J.; Faust, R.P.; Johnson, J.L.; Babior, B.M. Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase. Department of Molecular and Experimental Medicine, The Scripps Research Institute, La Jolla, California 92037, USA.

34. Análise das Proteínas Ligadoras de DNA por Ensaio de Alteração de Mobilidade Eletroforética em Gel de Poliacrilamida (EMSA)

Carla Cristine Kanunfre
Kelly Aparecida Kanunfre
Anna Karenina Azevedo Martins

Introdução

Uma das mais importantes descobertas contemporâneas na biologia molecular foi a de que muito dos processos de diferenciação, metabolismo e funcionalidade celulares são regulados durante a transcrição gênica, e por sua vez, têm seu controle realizado por proteínas que, interagindo com determinadas sequências do DNA, podem induzir ou reprimir a expressão de um ou mais genes.

Estas proteínas, com funções bastante específicas interagem basicamente com sequências de nucleotídeos do DNA em três diferentes regiões: região promotora, região acentuadora (intensificadora) e região silenciadora, conhecidas como regiões regulatórias. As regiões promotoras correspondem a sequências de nucleotídeos, sítios de ligação para a RNA polimerase II, enzima que efetivamente promove a transcrição do DNA em RNA; as regiões acentuadoras correspondem às sequências de nucleotídeos, sítios de ligação a proteínas reguladoras da transcrição que podem interagir com a RNA polimerase II para efetivar o processo transcricional e finalmente as regiões silenciadoras correspondem às sequências de nucleotídeos, sítios para interações com proteínas reguladoras que bloqueiam a transcrição de um determinado gene, ou seja, inibem a expressão deste.

Os avanços nesta área de pesquisa devem-se, pelo menos em parte, ao fato de que novos métodos para estudos de proteínas que interagem com o DNA têm sido desenvolvidos e disponibilizados para a comunidade científica. Especificamente, duas destas metodologias são utilizadas mais comumente para esta análise das proteínas ligadoras de DNA: *footprinting* e EMSA. A primeira, *footprinting*, é utilizada para determinar os locais nos quais as proteínas se ligam ao DNA (sequência nucleotídica), e a segunda, *EMSA - ensaio de alteração (retardamento) de mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida ou band shift ou gel shift*, é utilizada para identificar proteínas ligadoras de DNA, constituindo-se também em uma ferramenta importante para análise da atividade de fatores de transcrição *in vitro*.

No ensaio de *footprinting*, um fragmento de DNA é marcado radiativamente em uma extremidade. O DNA marcado é incubado com uma proteína de interesse e sujeito à digestão parcial com a DNase. O princípio do método é que as regiões do DNA nas quais a proteína de interesse se liga ficam protegidas da digestão pela DNase. Portanto, essas regiões podem ser identificadas por comparação dos produtos de digestão do DNA ligado à proteína com aqueles resultantes de tratamento idêntico com DNase de uma amostra de DNA que não foi incubada com a proteína de interesse.

Nota: Este método *footprinting* e suas variações podem ser encontradas em literatura especializada.

Como nosso enfoque neste capítulo é o EMSA segue uma descrição mais detalhada dos procedimentos necessários para sua realização.

EMSA – Um Método para Detecção de Proteínas Ligadoras de DNA

O EMSA foi desenvolvido em 1981 por duas duplas de pesquisadores Freid; Crothers; Garner e Revsin, e caracteriza-se por ser um método simples e sensível, cujo princípio está mostrado na figura 34.1 intitulada: Desenho esquemático do EMSA.

Neste ensaio uma molécula de DNA irá, ao ser submetida a um campo elétrico, mover-se rapidamente em direção a um eletrodo positivo, devido à presença de carga negativa em sua estrutura química. Quando uma proteína ligadora de DNA (proteína A) interage com um fragmento de DNA marcado, irá retardar sua migração através do gel.

Conforme está mostrado no fluxograma da figura 34.2, no EMSA, um fragmento pequeno de DNA, com tamanho e sequência específicos (obtido por meio de clonagem ou sintetizado artificialmente), é marcado radiativamente e incubado com um lisado (extrato) celular que pode ser tanto total quanto nuclear. A mistura é então aplicada em um gel de poliacrilamida não desnaturante e submetida à eletroforese. Caso o lisado contenha uma proteína ligadora de

DNA, como por exemplo um fator de transcrição ativado, esta liga-se ao fragmento de DNA formando um complexo proteína-DNA que irá retardar o movimento do fragmento

de DNA através do gel, pois o complexo ficará retido, migrando com velocidade menor do que o fragmento de DNA livre, por apresentar maior peso molecular.

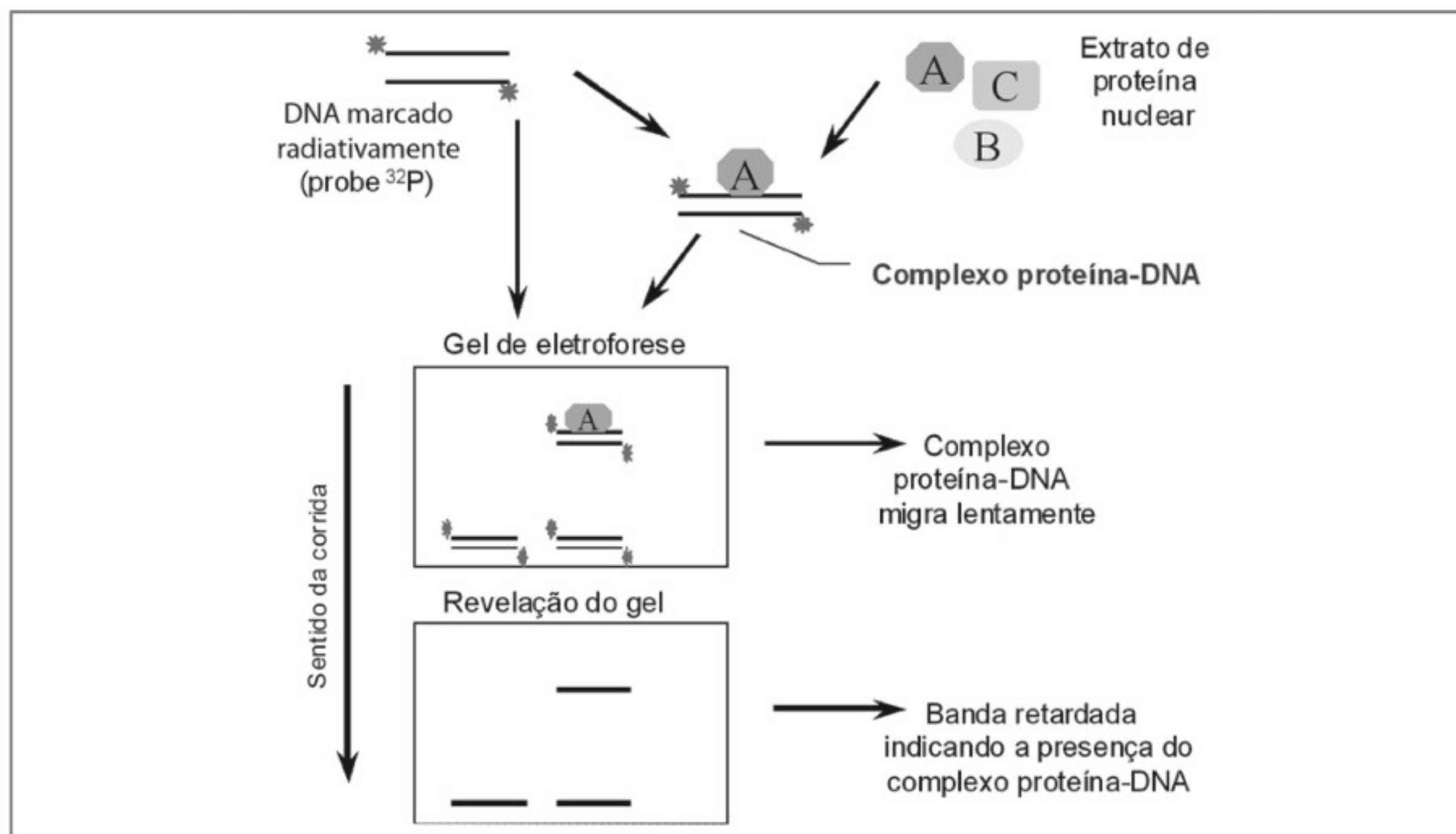


Figura 34.1 – Desenho esquemático do EMSA. Neste ensaio quando uma proteína ligadora de DNA (proteína A) interage com um fragmento de DNA marcado, irá retardar sua migração eletroforética através do gel de poliacrilamida.

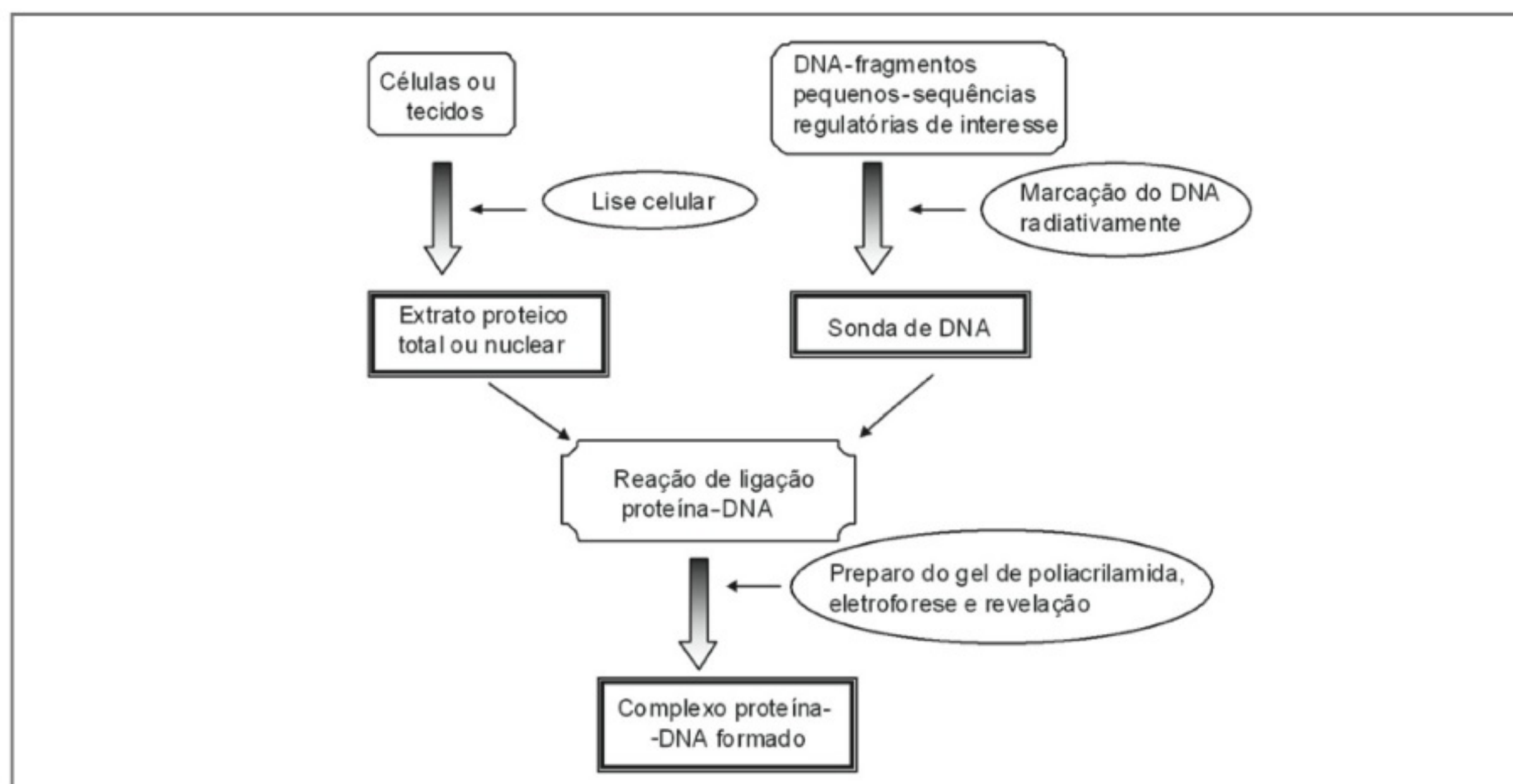


Figura 34.2 – Fluxograma dos passos para a realização do EMSA. Um pequeno fragmento de DNA é marcado radioativamente e incubado com um lisado (extrato nuclear ou celular). A mistura é aplicada em gel de poliacrilamida não desnaturante e submetida a eletroforese. O complexo formado é visualizado pela revelação do gel conforme descrito no capítulo.

O Protocolo do EMSA pode ser dividido em 4 etapas:

Etapas 1:

- A) Preparo da sonda de DNA – refere-se à marcação, geralmente com ^{32}P radiativo, dos fragmentos de DNA complementares que contêm o sítio de reconhecimento de interesse (sequência regulatória).

Etapas 2:

- B) Preparo do extrato proteico total ou nuclear – consiste em isolar as frações de proteínas celulares ou nucleares dos demais componentes celulares.

Etapas 3:

- C) Reações de ligação proteína, DNA *in vitro* – etapa na qual o extrato proteico total ou nuclear é incubado com o fragmento de DNA marcado para a formação do complexo proteína-DNA.

Etapas 4:

- D) Preparo do gel de poliacrilamida não desnaturante, eletroforese e revelação do gel – processo de separação proteica/DNA em suporte (gel de poliacrilamida) de acordo com carga e massa molecular sob campo elétrico, e finalmente visualização da formação ou não do complexo proteína-DNA.

Procedimento Experimental

Etapas 1

Seleção e Preparo da Sonda de DNA

Tanto fragmentos de restrição obtidos de plasmídeos recombinantes ou de outra origem que contenham sequências regulatórias de interesse (50 a 250 pb) como oligonucleotídeos sintetizados artificialmente (20 a 50 pb) podem ser utilizados como sonda de DNA no EMSA. O tipo e o tamanho da sonda dependem da natureza da investigação. Se a proteína a ser detectada é, por exemplo, um fator de transcrição conhecido previamente estudado, oligonucleotídeos sintéticos podem ser utilizados como sonda. Entretanto fragmentos maiores devem ser utilizados quando o objetivo for determinar as possíveis proteínas ligadoras de DNA de determinada sequência regulatória de genes clonados. Os procedimentos para marcação da sonda estão descritos abaixo.

Marcação da sonda de DNA obtida a partir de plasmídeo recombinante – as sondas de DNA obtidas a partir de plasmídeo recombinante podem ser marcadas

tanto na extremidade 3' quanto na 5'. A extremidade 3' de uma sonda obtida a partir da digestão de um plasmídeo com enzimas de restrição pode ser marcada utilizando a atividade polimerase 5'-3' do fragmento Klenow da DNA polimerase I (protocolo 1). Este procedimento de marcação pode ser imediatamente utilizado após ensaio de digestão do plasmídeo sem a purificação prévia do fragmento de interesse (sonda). As sondas de DNA podem ainda ser marcadas na extremidade 5' utilizando a enzima T4 polinucleotídeo cinase (protocolo 3). Essa enzima catalisa a transferência do γ fosfato do ATP marcado com ^{32}P para o grupo hidroxil 5' da sonda de DNA, porém, como a maioria dos fragmentos obtidos por digestão com enzimas de restrição apresentam ainda o grupo fosfato ligado na extremidade 5', este deve ser removido utilizando-se a fosfatase alcalina (protocolo 2), pois somente as sondas de DNA desfosforiladas podem ser marcadas na extremidades 5' pela T4 polinucleotídeo cinase.

Protocolo 1 – Marcação da Extremidade 3' da Sonda de DNA Utilizando DNA Polimerase I (Fragmento Klenow) **Fonte: Garabedian et al. (1994)**

Reagentes:

- DNA contendo a sequência regulatória de interesse, ou seja, o plasmídeo ou qualquer outro fragmento de nucleotídeos que necessite ser clivado por enzimas de restrição.
- Tampão da enzima(s) de restrição 10 \times . Este tampão normalmente acompanha a(s) enzima(s).
- Tampão TE (Tris-EDTA) (Tris-HCl a 10 mM, EDTA a 1 mM, pH 8,0).
- Mistura de deoxinucleotídeos-trifosfato concentrado 10 \times em tampão TE (Tris-EDTA). Cada deoxinucleosídeo-trifosfato deverá estar na concentração de 2,5 mM, exceto aquele que será utilizado para a marcação, geralmente a adenosina ou citosina trifosfato (dATP e dCTP).
- Enzima(s) de restrição apropriada(s) que será(ão) utilizada(s) para isolar a sonda.
- [α - ^{32}P] dNTPs a 3.000 Ci/mmol, 10 mCi/mL, geralmente dATP ou dCTP.
- DNA polimerase I (fragmento *Klenow*) + tampão concentrado 10 \times .
- EDTA a 0,5 M, pH 8,0.

Método

Obtenção da Sonda

1. Misturar em um tubo de microcentrífuga os seguintes reagentes:

DNA a ser digerido.....1 µg
 Tampão da(s) enzima(s) de restrição
 concentrado 10 ×1 µg
 H₂O bidestilada autoclavada q.s.p.....10 µL
 Enzima(s) de restrição.....5 U

2. Incubar a mistura a 37°C por 1-2 horas, ou até que o DNA seja completamente digerido poderá ser visualizada por eletroforese em gel de agarose.

Marcação da Sonda

3. Misturar em um tubo de microcentrífuga os seguintes reagentes:

DNA digerido.....1 µg em 10 µL
 Tampão da *Klenow** concentrado 10×.....1 µL
 H₂O bidestilada autoclavada q.s.p.....25 µL
 Mistura de nucleotídeos concentrado 10×.....2,5 µL
 [α -³²P] dNTP.....10 µL
 DNA polimerase I (fragmento *Klenow*).....20 U

4. Incubar a mistura à temperatura ambiente por 10-15 minutos.
5. Adicionar 1 µL de EDTA a 0,5 M (pH 8,0), para finalizar a reação.
6. Remover o radiativo não incorporado através de coluna Sephadex G50, conforme instruções do fabricante.
7. Ressuspender o DNA marcado em 20 µL de tampão de TE.

* Tampão da *Klenow* concentrado 10× (500 mM de Tris, 100 mM de MgCl₂, 10 mM de DTT, 0,5 µg/µL de BSA).

8. Proceder ao isolamento da sonda por eletroforese em gel de agarose com baixo ponto de fusão (*low melting temperature*) ou em gel de poliacrilamida seguindo sua purificação. Nota: Para proceder a purificação da sonda consultar protocolos descritos em literatura adequada.

Protocolo 2 – Remoção do Grupo Fosfato da Extremidade 5' Utilizando a Fosfatase Alcalina

Fonte: Garabedian et al. (1994)

Reagentes:

- Fosfatase alcalina.
- Tampão da enzima fosfatase concentrado 10×.
- Tampão TE (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8,0).
- Tampão da enzima de restrição concentrado 10×.
- Enzima(s) de restrição apropriada(s).
- DNA a ser digerido.
- EDTA a 0,5 M pH 8,0.
- Fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção de 24:24:1.
- Clorofórmio:álcool isoamílico na proporção de 24:1.

Método:

Obtenção da sonda

1. Misturar em um tubo de microcentrífuga os reagentes:

DNA a ser digerido.....10 µg
 Tampão da(s) enzima(s) de restrição
 concentrado 10×.....10 µL
 H₂O bidestilada autoclavada q.s.p.....100 µL
 Enzima(s) de restrição.....10-20 U

2. Incubar a mistura a 37°C por 1-2 horas, ou até que o DNA seja completamente digerido a qual poderá ser acompanhada por visualização por eletroforese em gel de agarose.

Remoção do Grupo Fosfato da Extremidade 5'

3. Misturar em um tubo de microcentrífuga os seguintes reagentes:

DNA a ser digerido.....100 µg
 Tampão da enzima fosfatase concentrado 10×.....10 µL
 Fosfatase alcalina.....0,1 U/µg de DNA

4. Incubar a 37°C por 30 minutos.
5. Adicionar 10 µL de EDTA a 0,5 M (pH 8,0) e aque-

cer a 68°C por 10 minutos, para finalizar a reação. Deixar esfriar a mistura.

6. Extrair o DNA (sonda) primeiramente com 100 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:24:1) e posteriormente com 100 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1).
7. Precipitar o DNA com etanol e ressuspender o DNA precipitado em tampão TE que pode ser estocado a -20°C.

Protocolo 3 – Marcação da Extremidade 5' da Sonda de DNA Utilizando T4 Polinucleotídeo Cinase

Fonte: Garabedian et al. (1994)

Reagentes:

- DNA desfosforilado 0,2 mg/mL.
- Tampão da enzima T4 polinucleotídeo cinase 10×.
- [γ -³²P] ATP a 7.000 Ci/mmol, 160 mCi/mL.
- Tampão TE.
- T4 polinucleotídeo cinase.
- Fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção de 24:24:1.

Método:

1. Misturar em tubo de microcentrífuga os reagentes:
DNA desfosforilado (0,2 mg/mL).....10 µL
Tampão da enzima T4 polinucleotídeo cinase 10×.....2 µL
H₂O bidestilada autoclavada q.s.p.....20 µL
[γ -³²P] ATP.....1-2 µL
T4 polinucleotídeo cinase.....10 U
2. Incubar a mistura a 37°C por 30-60 minutos.
3. Adicionar 80 µL do tampão TE para finalizar a reação.
4. Extrair o DNA (sonda) com 100 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (24:24:1).
5. Remover o radiativo não incorporado por meio de coluna Sephadex G50, conforme instruções do fabricante.

Marcação da sonda de DNA obtida a partir de oligonucleotídeos sintéticos – os oligonucleotídeos sintéticos são geralmente sintetizados como fitas complementares de DNA que devem ser unidas de maneira a formar a dupla fita de DNA, a fim de serem utilizadas no EMSA. Este processo de hibridização (anelamento) das fitas pode ser feito misturando quantidade equimolares dos oligonucleotídeos ressuspensos em tampão

TE, aquecendo-os à temperatura de 80 a 100°C por 5 minutos, seguido do resfriamento lento da mistura à temperatura ambiente.

Os oligonucleotídeos podem ser desenhados de maneira a possuir sítios de enzimas de restrição, o que permite que ele seja clonado, gerando um estoque desses oligonucleotídeos para posteriores experimentos.

Como os oligonucleotídeos são geralmente sintetizados sem o grupamento fosfato na extremidade 5', podem ser diretamente marcados utilizando a T4 polinucleotídeo cinase e [γ -³²P] ATP (protocolo 4).

Protocolo 4 – Marcação de Oligonucleotídeos Sintéticos Utilizando a T4 Polinucleotídeo Cinase

Fonte: Garabedian et al. (1994)

Reagentes:

- Oligonucleotídeo sintético dupla fita (10 pmol/µL).
- Tampão da enzima T4 polinucleotídeo cinase concentrado 10×.
- [γ -³²P] ATP a 7.000 Ci/mmol, 160 mCi/mL.
- Tampão TE.
- T4 polinucleotídeo cinase.
- Fenol:clorofórmio (1:1).
- Coluna Sephadex G50.

Método 1

1. Misturar em um tubo de microcentrífuga os seguintes reagentes:
Oligonucleotídeo sintético (10 pmol/µL).....1 µL
Tampão da enzima T4 polinucleotídeo cinase concentrado 10×.....2 µL
[γ -³²P] ATP a 7.000 Ci/mmol, 160 mCi/mL.....1-2 µL
T4 polinucleotídeo cinase.....10 U
H₂O bidestilada autoclavada q.s.p.....20 µL
2. Incubar por 30-60 minutos à 37°C.
3. Adicionar 80 µL de TE e aqueça a 68°C por 10 minutos para finalizar a reação de marcação.
4. Remover o radiativo [γ -³²P] ATP não incorporado utilizando colunas Sephadex G50.

Método 2

1. Misturar em um tubo de microcentrífuga os reagentes:
Oligonucleotídeo sintético (10 pmol/µL).....1 µL

Tampão da enzima T4 polinucleotídeo cinase 10×.....2 µL
 [γ-³²P] ATP a 7.000 Ci/mmol, 160 mCi/mL.....1-2 µL
 T4 polinucleotídeo cinase.....10 U
 H₂O bidestilada autoclavada q.s.p.....20 µL

2. Incubar por 60 minutos a 37°C.
3. Adicionar 80 µL de TE/ 0,1 M-NaCl.
4. Extrair o DNA (sonda) com 100 µL de fenol: clorofórmio (1:1).
5. Remover o radiativo [γ-³²P] ATP não incorporado, utilizando coluna Sephadex G50.

Etapa 2

Preparo do Extrato Proteico Total ou Nuclear

O extrato de proteínas a ser utilizado no EMSA pode ser tanto total quanto nuclear, e existem algumas vantagens na utilização de um ou de outro. A utilização de extratos nucleares resulta na detecção de proteínas ligadoras de DNA (fatores de transcrição) restritos do núcleo, e é claro as que têm maior potencial de ligação ao DNA cromossômico. Entretanto, a utilização de extratos totais pode revelar proteínas que podem ligar-se ao DNA que estariam no citoplasma e que são translocadas para o núcleo em respostas a certos estímulos. Esta translocação de proteínas ligadoras de DNA do citoplasma para o núcleo pode ser estudada por comparação de um EMSA realizado a partir de um extrato total e de um nuclear.

O extrato total é mais fácil de ser obtido, pois requer menos etapas de preparação, sendo seu uso favorável para tecidos em que muitas etapas de manipulação poderiam acarretar perdas ou danos do conteúdo proteico. O extrato total é também recomendado para amostras congeladas, pois o processo de congelamento causa danos na membrana nuclear com perda da integridade do núcleo, impedindo assim a preparação de um extrato nuclear.

Os extratos proteicos podem ser preparados a partir de células ou tecidos sendo primeiramente necessário:

Para células aderidas:

- Desprezar o meio de cultura e lavar as células duas vezes com PBS.
- Adicionar 5-7 mL de PBS, remover as células aderidas e transferir para um tubo cônico e centrifugar as células a 750 × g por 5 minutos a 4°C.
- Proceder à extração proteica total ou nuclear conforme caso.

Para células em suspensão:

- Transferir a suspensão de células para um tubo cônico e centrifugar a 750 × g por 5 minutos a 4°C. Retirar o sobrenadante e ressuspender o sedimento com PBS e novamente centrifugar as células a 750 × g por 5 minutos a 4°C.

- Proceder à extração proteica total ou nuclear conforme caso.

Para tecidos:

- Remover o tecido e cortar em fragmentos pequenos. Lavar duas vezes em PBS e congelar em N₂ líquido. Colocar os pedaços em um gral e triturar com o pistilo. Nota: tanto o gral quanto o pistilo devem estar gelado (-70°C). Ressuspender o material triturado em PBS gelado e transferir para um tubo cônico (15 mL). Centrifugar a 1.000 × g por 5 minutos.

- Proceder à extração proteica total ou nuclear conforme caso.

Extração de proteínas totais – o extrato total pode ser obtido utilizando-se o Protocolo para extração de proteínas totais descrito no capítulo 23.

Extração de proteínas nucleares – a extração de proteínas nucleares pode ser feita conforme descrito nos protocolos 5 e 6.

Nota: Usar todas as soluções de extração geladas e manter as amostras no gelo durante todo o procedimento.

Protocolo 5: Preparo do Extrato Proteico Nuclear

Fonte: Carvalho (1997)

1. Descartar o sobrenadante, ressuspender as células em 1 mL de tampão hipotônico (Quadro 34.1) e transferir para um tubo de microcentrífuga.
2. Sedimentar as células por centrifugação (12.000× g, 15 segundos).
3. Descartar o sobrenadante, ressuspender o sedimento em 400 µL de tampão hipotônico e manter em gelo por 10 minutos.
4. Adicionar Nonidet P-40 (0,1%) ou Igepal CA-630 (0,1%) para lisar as células e agitar em vórtice por 30 segundos à velocidade máxima.

Nota: Usar: 40 µL de Nonidet P-40 a 1% em H₂O ou 40 µL Igepal CA-630 a 1% em H₂O.

5. Centrifugar a 12.000 × g por 30 segundos, obtendo-se assim a fração nuclear (sedimento) e a fração citoplasmática (sobrenadante).
6. Retirar a fração citoplasmática e guardar caso seja de interesse.

7. Lavar o sedimento nuclear com 100 μ L de tampão hipotônico, sem que seja quebrado.
8. Ressuspender os núcleos em 100 μ L de tampão de extração nuclear (Quadro 34.2) e incubar por 30 minutos em gelo.
9. Centrifugar a 12.000 \times g por 30 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante o extrato nuclear.
10. Aliquotar o extrato nuclear e estocar a -70°C.

Nota: Fazer quatro alíquotas de 20 μ L cada e três de 5 μ L para quantificação de proteína. Os métodos de quantificação de proteínas estão descritos no capítulo 20.

Quadro 34.1 – Tampão hipotônico.

Concentração final	Solução-estoque	p/ 100 mL
HEPES, pH 7,9	50 mM	20 mL
KCl a 10 mM	250 mM	4 mL
EDTA a 0,1 mM	0,5 M	20 μ L
EGTA a 0,1 mM	50 mM	20 μ L

Adicionar na hora do uso:

Concentração final	Solução-estoque	p/ 10 mL
DTT a 1,0 mM	100 mM	100 μ L
PMSF a 1,0 mM	200 mM	50 μ L
*2 μ g/mL de aprotinin	2 mg/mL	10 μ L
*2 μ g/mL de Leupeptina	2 mg/mL	10 μ L
*2 μ g/mL de Pepstatina	2 mg/mL	10 μ L

* Os três inibidores de proteases podem ser preparados separadamente ou juntos.

Quadro 34.2 – Tampão de Extração Nuclear.

Concentração final	Solução-estoque	p/ 20 mL
HEPES a 20 mM, pH 7,9	50 mM	2 mL
NaCl a 0,4 M de	5 M	1,6 mL
EDTA a 1,0 mM	0,5 M	40 μ L
EGTA a 1,0 mM	50 mM	400 μ L

Adicionar na hora do uso:

Concentração final	Solução-estoque	p/ 1 mL
DTT a 1,0 mM	100 mM	10 μ L
PMSF a 1,0 mM	200 mM	5 μ L
2 μ g/mL de Aprotinina	2 mg/mL	1 μ L
2 μ g/mL de Leupeptina	2 mg/mL	10 μ L
2 μ g/mL de Pepstatina	2 mg/mL	10 μ L

O extrato nuclear também pode ser obtido conforme descrito no protocolo descrito a seguir.

Protocolo 6: Preparo do Extrato Proteico Total ou Nuclear

1. Desprezar o sobrenadante e adicionar 400 μ L do tampão A (Quadro 34.3).
2. Agitar o tubo suavemente para ressuspender (manter o tubo a 4°C).
3. Deixar em repouso a 4°C por 10 minutos.
4. Transferir para o tubo de microcentrifuga.
5. Agitar em vórtice para romper as membranas.
6. Centrifugar em microcentrifuga (*spin*) por 10 segundos à velocidade máxima.
7. Descartar o sobrenadante.
8. Ressuspender o sedimento em 100 μ L do tampão B (Quadro 34.4).
9. Incubar no gelo por 20 minutos.
10. Centrifugar a 12.000 \times g por 2 minutos a 4°C.
11. Coletar o sobrenadante, aliquotar e estocar a -70°C.

Nota: Fazer quatro alíquotas de 20 μ L cada, e três de 5 μ L para quantificação de proteína. Os métodos de quantificação de proteínas estão descritos no Capítulo 20.

Quadro 34.3 – Tampão A.

Concentração final	Solução-estoque	p/ 100 mL
10 mM de HEPES KOH pH 7,9	0,1 M	1 mL
1,5 mM de KC	1 M	0,1 mL
10 mM de MgCl ₂	0,1 M	150 μ L
0,5 mM de DTT	500 mM	10 μ L
0,2 mM de PMSF	0,1 M	20 μ L
H ₂ O bidestilada auto-clavada	–	q.s.p. para 10 mL

Quadro 34.4 – Tampão B.

Concentração final	Solução-estoque	p/ 100 mL
20mM de HEPES KOH, pH 7,9	0,1 M	2 mL
420 mM de NaCl	1 M	4,2 mL
1,5 mM de MgCl ₂	0,1 M	150 μ L
0,2 mM de EDTA	20 mM	100 μ L
Glicerol a 25%	100%	2,5 mL
0,5 mM de DTT	500 mM	10 μ L
0,2 mM de PMSF	0,1 M	20 μ L
H ₂ O bidestilada auto-clavada	2 mg/mL	q.s.p. para 10 mL

Reação de Ligação e Eletroforese do Complexo Proteína-DNA

Uma ampla variedade de parâmetros pode influenciar na interação proteína-DNA e assim afetar o resultado do EMSA. Como exemplos temos cátions mono (Na^+ e K^+) e divalentes (Mg^{++}), pH, detergentes não iônicos (Nonidet P-40) temperatura e tempo de ligação, concentração de proteína e tipo e concentração de DNA competidor. Em adição, a composição do gel pode alterar significativamente o resultado do EMSA. Assim, cada um destes parâmetros deverá ser estudado separadamente, de maneira a estarem adequados.

Baixas concentrações de sais (< 150 mM de NaCl ou KCl) tendem a favorecer a interação proteína-DNA e a formação do complexo, e, contrariamente, altas concentrações de sais facilitam a dissociação. Ainda, baixas quantidades de detergentes não iônicos, tais como Nonidet P-40 (0,5-0,05%), podem “quelar” proteínas (albumina fetal bovina e insulina) e poliaminas, o que favorece a estabilidade do complexo proteína-DNA. A seguir, estão descritos alguns exemplos de tampões de ligação proteína-DNA utilizados e em seguida um Protocolo de reação de ligação proteína-DNA (protocolo 7).

A adição de um competidor de DNA não específico na reação de ligação proteína-DNA é importante quando se está tentando selecionar uma única proteína de ligação em um vasto número. Os mais comuns dos competidores de DNA utilizados são os copolímeros sintéticos como poli (dI-dC) ou poli (dA-dT). Sequências heterólogas tais como DNA de *E. coli*, DNA de esperma de salmão também podem ser utilizadas, porém devido a seus inúmeros sítios de ligação podem reduzir a quantidade de complexos proteínas-DNA específicos.

Etapas 3

Protocolo 7 – Reação de Ligação Proteína-DNA **Fonte: Garabedian et al. (1994)**

Reagentes:

- Tampão de ligação proteína-DNA 2×.
- DNA de esperma de salmão (5 mg/mL).
- Poli (dI/dC ou dA/dT) (1 mg/mL).
- Tampão de amostra (TBE concentrado 0,5×, glicérol a 10%, azul de bromofenol a 0,25%).

- Extrato de proteína total ou nuclear.
- Sonda marcada radiativamente com ^{32}P contendo o sítio de interesse.

Nota: 45 mM de Tris-borato e 1 mM de EDTA (tampão TBE).

Método

1. Misturar em um tubo de microcentrífuga os seguintes reagentes:

Tampão de ligação proteína-DNA 2×.....10 μL

DNA competidor não específico:

DNA de esperma de salmão ou timo.....1,2 μL
ou

Poli (dI/dC ou dA/dT).....3 μL

Extrato de proteína total ou

nuclear, 1 a 10 mg em volume máximo de.....10 mL

H_2O bidestilada q.s.p.....10 mL

Nota: No quadro 34.5, tem-se descrito várias possibilidades de obtenção de tampão de ligação proteína DNA 2×.

2. Incubar a mistura por 5-10 minutos à temperatura ambiente (22°C).
3. Adicionar 1 μL da sonda marcada com ^{32}P (1-10 μmol com aproximadamente 5.000 a 50.000 c.p.m. de contagem radiativa – contador beta) e incubar por 5-30 minutos à temperatura ambiente (22°C).
4. Adicionar 2 μL de tampão de amostra em cada reação de ligação e manter em gelo até sua aplicação no gel.

Nota: Recomenda-se aplicar as amostras imediatamente no gel evitando deixá-las muito tempo em gelo.

Uma vez formado o complexo proteína-DNA, a mobilidade deste em gel de poliacrilamida não desnaturante é determinada pelo seu tamanho, carga e conformação. Uma baixa força iônica do tampão de corrida (TBE concentrado 0,25-0,5×) pode estabilizar o complexo proteína-DNA, assim como alterações na porcentagem do gel de poliacrilamida, pH, força iônica do tampão/gel ou temperatura podem melhorar ou prejudicar a mobilidade do complexo ou ainda até mesmo revelar novas interações proteína-DNA. A preparação do gel de poliacrilamida não desnaturante, o preparo das amostras e a condição de corrida do EMSA estão descritas no protocolo 8.

Quadro 34.5 – Diferentes tampões de ligação proteína-DNA 2×.

Tampão de ligação A – 2×	Tampão de ligação B – 2×	Tampão de ligação C – 2×	Tampão de ligação D – 2×
40 mM de Tris-HCl (pH 7,9)	40 mM de Tris-HCl (pH 7,9)	20 mM de HEPES (pH 7,9)	20 mM de Tris-HCl (pH 7,5)
100 mM de NaCl	100 mM de NaCl	100 mM de KCl	100 mM de KCl
Glicerol a 20%	4 mM de MgCl ₂	Glicerol a 20%	Glicerol a 20%
0,2 mM de DTT	2 mM de EDTA	0,2 mM de EDTA	1 mM de DTT
	Glicerol a 20%		
	Glicerol a 20%		
	de Nonidet P-40 a 0,2%		
	100µg/mL de BSA		

Etapa 4

Protocolo 8 – Preparo do Gel de Poliacrilamida

Não Desnaturante, Preparo e Aplicação das Amostras

Fonte: Garabedian et al. (1994)

Reagentes:

- Solução-estoque de acrilamida/bisacrilamida 30% – proporção 30:1.
- Tampão TBE concentrado 0,5× (45 mM de Tris-borato e 1 mM de EDTA).
- Persulfato de amônio a 10%.
- TEMED – N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina.

Método

Nota: As instruções sobre os equipamentos utilizados em eletroforeses, bem como a montagem da cuba de eletroforese e das placas de vidro necessárias para o preparo do gel podem ser obtidas no capítulo de 23. Recomenda-se o uso de cubas grandes de forma que o gel tenha também uma grande dimensão especificamente em comprimento para garantir uma boa separação do complexo proteína-DNA.

1. Montar o gel de poliacrilamida em um tubo cônico (50 mL) escolhendo a porcentagem de gel mais adequada para o tamanho do complexo proteína-DNA a ser formado. No quadro 34.6 encontramos os volumes de cada reagente para o preparo de 40 mL de gel nas diferentes porcentagens de poliacrilamida.

Nota: Caso se desconheça o tamanho do complexo proteína-DNA formado, recomenda-se utilizar um gel de poliacrilamida de 6% (Quadro 34.6).

2. Deixar o gel polimerizar entre as placas de vidro pelo tempo mínimo de 1 hora.
3. Colocar o gel de poliacrilamida em cuba de eletroforese apropriada e preenchê-la com o tampão de

corrida (TBE concentrado 0,5×), de forma a cobrir totalmente o gel, evitando a formação de bolhas.

Nota: Caso ocorra a formação de bolhas, retirá-las com o auxílio de uma pipeta Pasteur ou uma seringa.

4. Realizar uma pré-corrida do gel por cerca de 60 a 90 minutos à temperatura ambiente à 200 V ou a 4°C a 350 V. Nota: a corrente elétrica nestas condições deverá oscilar entre 10 e 25 mA. Durante a pré-corrida, alterações do pH e força iônica do tampão podem ocorrer, assim recomenda-se realizar a pré-corrida e a corrida propriamente dita com recirculação de tampão. Caso o sistema de eletroforese não permita esta recirculação, a troca do tampão entre a pré-corrida e a corrida necessária para garantir um padrão correto de migração do complexo proteína-DNA.
 5. Aplicar 10 µL de cada amostra (mistura de reação) em cada poço do gel de poliacrilamida submetendo-as a eletroforese em 200 V (temperatura ambiente) ou 350 V (4°C) por 1 a 2 horas, ou até que o corante azul de bromofenol (marcador de migração eletroforética) atinja o final do gel.
 6. Ao término da corrida, retirar as placas da cuba de eletroforese e marcar o local de aplicação de sua primeira amostra. Posteriormente, retirar os espaçadores das placas e abri-las cuidadosamente com o auxílio de uma espátula.
- Nota:** Caso durante este procedimento o gel enrugue ou dobre, utilizar H₂O bidestilada para esticá-lo.
7. Sobre o gel de poliacrilamida que estará ainda sobre umas das placas de vidro, colocar um pedaço de papel Whatman de 3 MM de tamanho similar.
 8. Cuidadosamente, retirar o papel sobre o qual o gel de poliacrilamida deverá estar aderido, e cubra-o com um pedaço de plástico fino (comumente utilizado para cobrir alimentos).

Nota: O plástico deverá cobrir apenas a parte exposta do gel e não atrás do papel de Whatmann, pois assim prejudicará o processo de secagem do gel.

9. Secar o gel a 80°C sob vácuo por 30 a 90 minutos.

Nota: É extremamente importante que o gel esteja bem seco para se proceder à revelação-visualização do complexo formado.

Quadro 34.6 – Preparo de gel de Poliacrilamida (%).

Soluções-estoque %	4,0	6,0	8,0
Acrilamida a 30% (mL)	5,3	8,0	10,75
H ₂ O bidestilada (mL)	29,7	27,0	25,25
TBE concentrado 5× (mL)	4,0	4,0	4,0
Persulfato de amônio a 10% (mL)	0,4	0,4	0,4
TEMED (μL)	40	40	40

Revelação ou Visualização do Complexo Proteína-DNA Formado

Para a visualização do complexo formado, o gel seco pode ser exposto em um *phosphor screen* por 12-24 horas, sendo o sinal obtido com o uso de equipamento específico ou ainda o gel poderá ser autorradiografado, sendo exposto a uma película fotográfica (filme de raios X) por 12-24 horas e revelado em processo normal. O resultado deste experimento pode ser visto na figura 34.3.

EMSA – Algumas Considerações

O EMSA, conforme mencionado, constitui-se também em uma ferramenta importante para análise da atividade de fatores de transcrição *in vitro*, pois estes são proteínas reguladoras que se ligam às sequências acentuadoras (intensificadoras) do DNA, promovendo a transcrição gênica. Estas proteínas auxiliares da transcrição exercem papel central na regulação da expressão gênica.

Os fatores de transcrição compreendem uma ampla categoria de proteínas exigidas pela RNA polimerase II para iniciar o processo de transcrição. Apesar de muito heterogêneas, estas proteínas, em geral, constituem-se de pelos menos dois domínios funcionais principais: uma região da proteína para a ligação ao DNA e outra para a ativação da transcrição por interação com outros componentes da maquinaria transcricional.

Os fatores de transcrição estão classificados em dois tipos principais:

1. Fatores gerais de transcrição – são necessários para a expressão de todos os genes transcritos pela RNA

polimerase II, constituindo a maquinaria básica de transcrição de todas as células, como, por exemplo, a proteína que se liga ao sítio TATA *box* (TBP).

2. Fatores de transcrição adicionais ou específicos – são responsáveis pela regulação da expressão de genes-alvos, ou seja, aqueles que apresentam sequências consenso específicas para estas proteínas. No quadro 34.7 podemos observar alguns exemplos desta segunda classe de fatores de transcrição.

Muitos fatores de transcrição têm sido identificados em células eucarióticas e alguns desses amplamente estudados, como é o caso do fator de transcrição NF-κB.

Quadro 34.7 – Exemplos de fatores de transcrição específicos e sítios de ligação no DNA.

Fator de transcrição	Sítio de ligação consenso
Fator Sp 1, do inglês <i>Specificity protein</i>	GGGCGG
Fator C/EBP, do inglês <i>CCA-AT/enhancer binding protein</i>	CCAAT
Fator AP1, do inglês <i>Activator protein 1 (AP1)</i>	TGACTCA
Fatores OCT-1 e OCT - 2, do inglês <i>Octamer binding proteins</i>	ATGCAAAT
Fatores E12, E47, E2 - 2, do inglês <i>E-box binding proteins</i>	CANNTG*
Fator NFκ-B, do inglês <i>Nuclear factor κ-B</i>	GGGAATTTCC

N = qualquer nucleotídeo.

Identificação das Proteínas Ligadoras de DNA pela Adição de Anticorpos Específicos ao EMSA

Pode-se verificar se a banda “retardatária”, detectada no EMSA, está relacionada a determinada proteína de interesse por meio de um ensaio conhecido como *antibody supershift assay*. Neste ensaio, incuba-se o lisado proteico (extrato total ou nuclear) primeiramente com o anticorpo específico da proteína que se quer identificar e posteriormente com a sonda marcada. Caso o anticorpo específico reconheça a proteína ligadora de DNA, ocorrerá a formação de um complexo anticorpo-proteína-DNA (*supershift*) com migração mais lenta que o complexo proteína-DNA. Caso o anticorpo utilizado ligue-se ao sítio da proteína (fator de transcrição), essencial para sua ligação ao DNA, ocorrerá o desaparecimento da banda “retardatária”, devido à não formação do complexo proteína-DNA.

Verificação da Especificidade do Complexo Proteína-DNA pela Adição de Excesso em Molaridade de Fragmentos de DNA Não Marcados

A especificidade da sequência de DNA do complexo proteína-DNA pode ser testada por competição da ligação da proteína com os mesmos fragmentos de DNA utilizados como sonda, porém não marcados radiativamente. Se um excesso em molaridade destes fragmentos for adicionado na reação de ligação, muito desta proteína se ligará a este fragmento de DNA não marcado, assim menos proteína da mistura de reação estará disponível para ligar-se ao DNA marcado (sonda), resultando na redução ou eliminação da banda correspondente ao complexo formado.

Avaliação da Atividade de Fatores de Transcrição *In Vitro*, pela Adição de Ligantes em Potencial

Algumas proteínas ligadoras de DNA são receptores de substâncias endógenas como, por exemplo, os receptores para ácido retinóico e os receptores para esteroides. A ligação de tais substâncias a estes receptores os capacita a desempenhar o papel de fatores de transcrição, conhecidos como fatores de transcrição ligante dependente, ou seja, que dependem da presença de um ligante/ativador (substância endógena) para iniciar o processo de transcrição e para que estes adquiram conformação adequada para ligarem-se ao DNA. Assim, a adição de ligantes ao meio de cultura de células, antes do preparo do extrato proteico, ou no momento da realização da reação de ligação proteína-DNA, pode permitir a avaliação da atividade de fatores de transcrição *in vitro*.

Outras Fontes para Obtenção de Informações sobre EMSA

A internet constitui hoje a ferramenta mais amplamente utilizada em pesquisa, não somente bibliográfica mas também como fonte de consulta para a obtenção de protocolos e esclarecimento de dúvidas. Existem vários *sites*, nos quais informações sobre EMSA podem ser encontradas, incluindo os citados abaixo:

- http://www.protocol-online.org/prot/Molecular_Biology/DNA-Protein_Interactions/Band_Shift_Assay/
- <http://www.bio.com/protocolstools/protocol.jhtml?id=p511>

- <http://www.bio.com/protocolstools/protocol.jhtml?id=p1134>
- http://www.pharma.ethz.ch/institute_groups/biomacromolecules/protocols/bandshift
- http://www.scienceboard.net/resources/protocols.asp?action=article&protocol_id=73&criteria=
- http://en.wikipedia.org/wiki/Band_shift_assay
- <http://www.molecularstation.com/protocol-links/>
- <http://biowww.net/detail-1022.html>

Ensaio para a Detecção da Interação DNA-proteína Baseado em ELISA

Uma outra forma de se estudar a atividade de fatores de transcrição é usando-se a técnica de ELISA, já bem estabelecida, para detectar a interação de proteínas a uma sequência específica de DNA. Esta é uma abordagem relativamente nova, comercializada por empresas que fornecem reagentes e *kits* da área de biologia molecular. Esta técnica representa uma alternativa rápida e simples para o uso do EMSA.

O princípio da técnica é o mesmo do EMSA, com a vantagem de empregar volumes menores exatamente por ser baseado no ensaio de ELISA. O ensaio é realizado em placas de 96 escavações. As bases das escavações estão recobertas com duplas fitas de DNA contendo a sequência de ligação do fator de transcrição em estudo. Este fator, uma vez ativado dentro da célula, reconhece sua sequência consenso presente nas fitas de DNA às quais se liga. Este complexo é reconhecido por um anticorpo primário específico para o fator de transcrição em estudo. Na sequência, o anticorpo primário é reconhecido por um secundário acoplado à peroxidase de rabanete. Por fim, é determinada a intensidade de cor produzida após a adição do substrato da peroxidase e feita a análise comparativa ao controle. O procedimento completo leva em torno de 3 a 4 horas.

A figura 34.4 esquematiza a sequência de etapas necessárias para a realização da técnica. O uso de extratos celulares diferentes (nuclear, total, citoplasmático) permite abordagens diferentes na investigação da ativação de fatores de transcrição.

Apesar de ser uma técnica de fácil execução, a obtenção dos resultados não é tão simples. Como o controle do tempo de reação da enzima com seu substrato é manual, pequenas variações nesse intervalo podem refletir em grandes diferenças na leitura de várias amostras do mesmo grupo. Por isso, é necessário realizar os experimentos, no mínimo, em triplicatas.

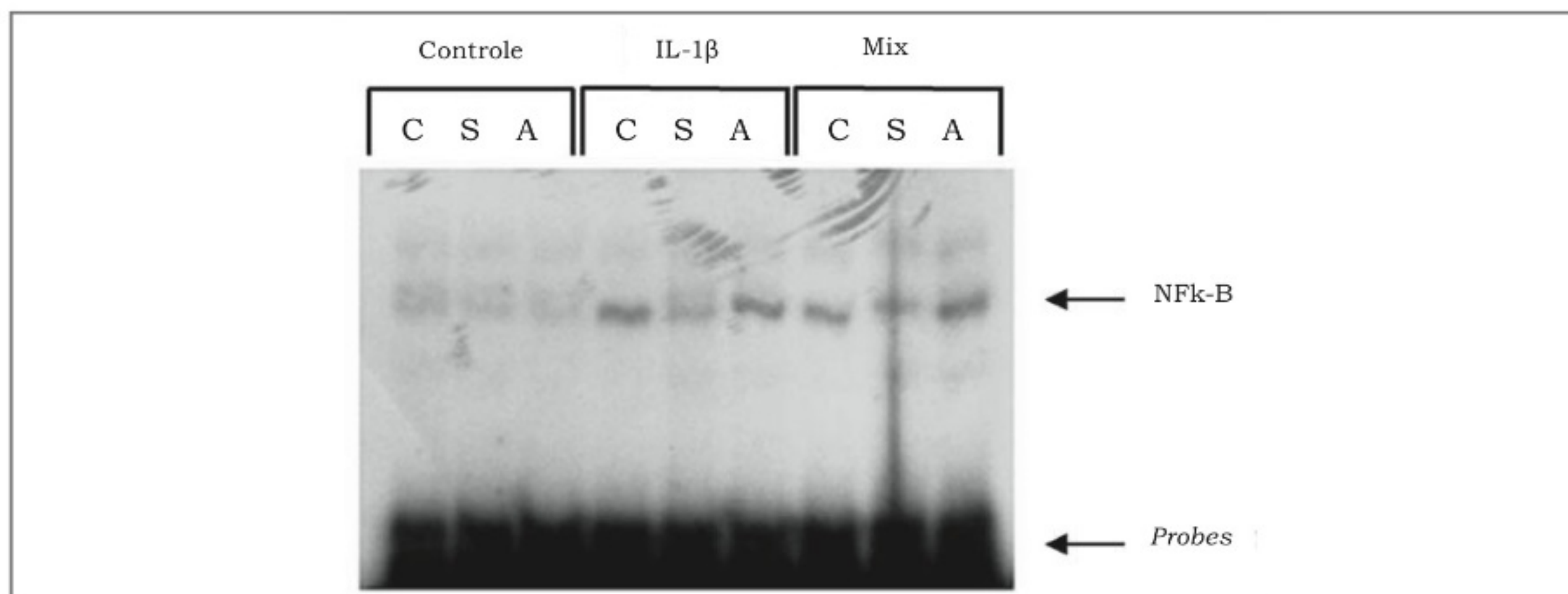


Figura 34.3 – EMSA para o NF κ -B em células RINm5F (linhagem secretora de insulina). Foram preparados extratos nucleares de células RINm5F controle (C), células RINm5F-MnSOD *sense* (S) e células RINm5F-MnSOD *antisense* (A) após 1 hora de exposição a IL-1 β (600 U/mL) ou a uma mistura de citocinas (IL-1 β – 60 U/mL; INF- γ – 14 U/mL; TNF- α – 185 U/mL). Cinco microgramas de extrato proteico celular foram incubados com óligos marcados com 32 P, representando a sequência consenso de ligação do NF κ -B no DNA (Azevedo-Martins et al., 2003).

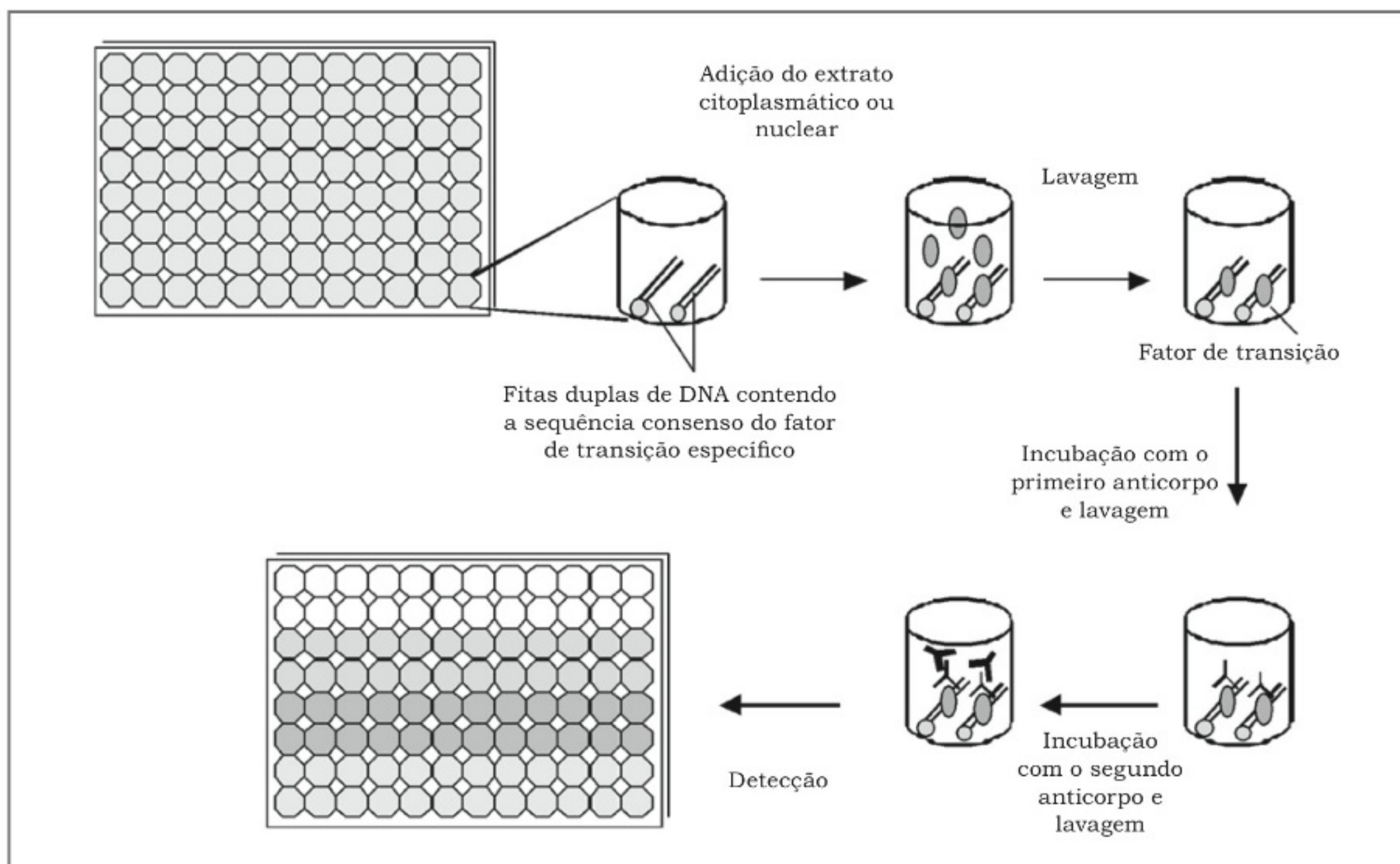


Figura 34.4 – Desenho esquemático das etapas de realização do ensaio para a detecção da interação DNA-proteína baseado em ELISA. O extrato celular ou nuclear é adicionado sob a sequência consenso do fator de transição presente nas fitas de DNA na placa de ELISA. Em seguida, a placa é lavada e adiciona-se o anticorpo primário. Após nova incubação e lavagem, o anticorpo secundário é acrescentado. Posteriormente, a placa é novamente lavada e adicionado o substrato com subsequente detecção.

Referências

- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, N.M.; Roberts, K.; Watson, J.D. *Biologia molecular da célula*. 3ª ed. Editora Artmed, 1997.
- Andrews, N.C.; Faller, D.V. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, 19(9):2499, 1991.
- Azevedo-Martins, A.K.; Lortz, S.; Lenzen, S.; Curi, R.; Eizirik, D.L.; Tiedge, M. Improvement of the mitochondrial antioxidant defense status prevents cytokine-induced nuclear factor-kappa B activation in insulin-producing cells. *Diabetes*, 52(1):93-101, 2003.
- Carvalho, L.H.S. Reversão fenotípica (tumoral-normal) induzida por hormônios glicocorticóides: bases moleculares. São Paulo, Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 1997. 80p
- Carvalho, H.F.; Recco-Pimentel, S.M. *A célula 2001*. 1ª ed. Editora Manole, 2001.
- Cooper, G.M. *A célula: uma abordagem molecular*. 2ª ed. Editora Artmed, 2001.
- Dent, C.L.; Latchman, D.S. The DNA mobility shift assay. In: Hames, B.D.; Higgins, S.J. *Gene transcription: a practical approach*. IRL Press, 1994. pp. 1-26.
- Dignam, J.P.; Lebovitz, R.M.; Roeder, R.G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.*, 11(5):1475-1489, 1983.
- Garabedian, M.J.; Labaer, J.; Liu, W-H.; Thomas, J.R. Analysis of protein – DNA interactions. In: Hames, B.D.; Higgins, S.J. *Gene transcription: a practical approach*. IRL Press, 1994. pp. 243-293.
- Gutman, P.D.; Cao, S.X.; Dave, H.P.; Mittelman, M.; Schechter, A.N. Binding of erythroid and non-erythroid nuclear proteins to the silencer of the human epsilon-globin-encoding gene. *Gene*, 110(2):197-203, 1992.
- Latchman, D.S. Methods for studying transcription factors. In: Latchman, D.S. *Eukaryotic transcription factors*. 2ª ed. Academic Press, 1995. pp. 21-52.
- Latchman, D.S. DNA sequences, transcription factors and chromatin structure. In: *Eukaryotic transcription factors*. Latchman, D.S. 3ª ed. Academic Press, 1998. pp. 1-19.
- Ouzounis, C.A.; Papavassiliou, A.G. DNA-binding motifs of eukaryotic transcription factors. In: *Transcription factors in eukaryotes*. Papavassiliou, A.G. 1ª ed. Ed. Springer, 1997. pp. 1-21.

35. Análise da Atividade Enzimática

Mariza Pires de Melo
Silvana Marina Piccoli Pugine

Introdução

As enzimas estão presentes em todos os tecidos e fluidos biológicos. Enquanto as enzimas intracelulares participam do conjunto de reações das diversas vias metabólicas, as enzimas presentes na membrana plasmática regulam as reações no interior das células em resposta aos sinais extracelulares e as enzimas extracelulares como algumas presentes no sistema circulatório, são responsáveis pela regulação do processo de coagulação sanguínea.

Devido ao seu papel na manutenção da vida, o estudo da regulação e da atividade das enzimas tem-se tornado um elemento-chave no diagnóstico clínico, na terapêutica e no avanço da ciência. Nas doenças de tecidos e órgãos, pode haver alterações na permeabilidade da membrana, ou morte celular e, com isso, enzimas dos tecidos difundem-se para o plasma sinalizando algum tipo de doença.

O nome enzima provém de *in yeasts*, no qual se suspeitava que as catálises biológicas estivessem envolvidas com a fermentação do açúcar em álcool. A primeira descoberta foi feita por Payen e Persoz, em 1833, quando encontraram uma substância termolábil no precipitado do álcool, extrato de malte, que convertia amido em açúcar, mais tarde denominada amilase. Pasteur em 1860, postulou que as enzimas estariam associadas à estrutura e à vida da célula. Somente em 1926, Summer evidenciou que a estrutura enzimática seria a de uma proteína a partir de estudos realizados com a urease cristalina obtida de feijão. Hoje, mais de milhares de diferentes enzimas são conhecidas, nas quais muitas são isoladas na forma pura homogeneizada e centenas na forma cristalizada.

Em 1894, Emil Fischer propôs o modelo chave-fechadura para explicar a ação enzimática. A enzima encaixa-se com o substrato específico no sítio ativo,

como uma chave e fechadura. Tanto a enzima quanto o substrato sofrem conformação para o encaixe. Um modelo menos rígido foi proposto em 1958 por Koshland, em que a enzima não aceita simplesmente o substrato. O substrato é distorcido para conformação exata do estado de transição, denominado encaixe por indução. Seja qual for o modelo, sabe-se que ao completar a reação catalítica a enzima libera o produto e retorna a sua forma original.

As enzimas são extremamente eficientes e aceleram em média 10^9 a 10^{12} vezes a velocidade da reação catalisada, transformando de 100 a 1.000 moléculas de substrato em produto por minuto de reação. Atuam em concentrações muito baixas e em condições suaves de temperatura e pH.

Como uma proteína, a enzima apresenta blocos de construção denominados de aminoácidos (Cap. 17). Algumas proteínas, tais como ribonucleases, quimiotripsina e tripsina, são constituídas apenas de aminoácidos. Outras enzimas, além dos aminoácidos, contêm componentes orgânicos e inorgânicos e são denominadas de proteínas conjugadas. A peroxidase e a catalase são exemplos de enzimas com estrutura conjugada e apresentam porfirina férrica como cofator.

A nomenclatura mais utilizada para as enzimas é feita pela adição do sufixo ase ao nome do substrato (chamada de Nome Recomendado), ou seja, a molécula na qual a enzima exerce sua ação catalítica. Neste caso, a enzima urease catalisa a hidrólise da ureia em amônia e CO_2 . Em 1999, a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (International Union of Biochemistry and Molecular Biology, IUBMB) propôs a classificação das enzimas em seis classes principais, nas quais estão inclusas subclasses de acordo com o tipo de reação catalisada. De acordo com esta sistemática, as enzimas são designadas por um nome recomendado, usualmente pequeno e apropriado para o uso diário, um

nome sistemático, o qual identifica a reação catalisada, e um número de classificação, o qual é usado quando uma identificação precisa é necessária. Como exemplo do novo sistema de classificação, considerar a reação abaixo catalisada por uma enzima:



O nome recomendado para esta enzima, o normalmente usado, é *creatina cinase*, e o nome sistemático, baseado na reação catalisada, é *ATP:creatina fosfotransferase*. Seu número de classificação é *EC 2.7.3.2*, onde *EC* representa *Enzyme Commission*, dada pela IUBMB; o primeiro dígito, 2, a classe (*transferase*), o segundo dígito, 7, a subclasse (*fosfotransferase*); o terceiro dígito, 3, a subsubclasse em que a *fosfotransferase* apresenta um grupo nitrogenado como aceptor; e o quarto dígito, 2, uma creatina cinase.

O estudo da velocidade das reações enzimáticas bem como os fatores que as influenciam são denominados de cinética enzimática. Em 1913, a teoria da ação e cinética enzimática foi desenvolvida por dois cientistas chamados L. Michaelis e M. L. Menten, na qual uma reação enzimática pode ser expressa pelo esquema abaixo, considerando-se apenas um substrato.



A partir do modelo de reação proposto por estes pesquisadores, desenvolveu-se uma equação que permite demonstrar como a velocidade de uma reação varia em função da concentração do substrato, a estes parâmetros relaciona-se também a constante de Michaelis-Menten (K_m) (Lehninger et al., 2000). A constante de Michaelis-Menten de uma enzima é, portanto, portadora de característica muito importante e fundamental, não apenas matematicamente na determinação da velocidade da reação catalisada, como também na avaliação da atividade e grau de purificação das enzimas (Lehninger et al., 2000).

A maioria das reações catalisadas por enzimas pode ser analisada quantitativamente seguindo a teoria proposta por Michaelis-Menten baseada na determinação da velocidade máxima de reação e concentração de substrato. Entretanto, muitas enzimas apresentam propriedades cinéticas que não podem ser explicadas pelo modelo proposto por Michaelis-Menten, as enzimas alostéricas, que têm a atividade alterada por moléculas que se ligam a locais diferentes do sítio catalítico (Lehninger et al., 2000). Mas o ponto importante para quantificar a atividade enzimática de qualquer grupo de enzimas é garantir que a reação se mantenha no estado de equilíbrio, denominado também de estado estacionário.

O equilíbrio de uma reação enzimática é estabelecido em segundos ou em poucos minutos após o início da reação dependendo da natureza química dos componentes da reação, e quando a concentração do complexo $E_{\text{enzima}}-S_{\text{substrato}}$ (ES) permanece constante; neste ponto a velocidade da reação é máxima e independe da concentração de substrato.

Nas análises quantitativas realizadas em laboratórios, a atividade das enzimas expressa o resultado como a atividade máxima, muitas vezes diferente das situações fisiológicas em que a concentração de substrato é muito inferior àquela que determinaria a velocidade máxima da reação. Nesta situação, em que a velocidade enzimática é muito menor que a velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$), a maior parte dos sítios ativos da enzima encontra-se desocupada e a velocidade de reação depende da velocidade de formação do complexo ES. Por outro lado, mesmo não correspondendo exatamente à situação fisiológica, o estudo de atividade máxima das enzimas representa importância sob os aspectos práticos e científicos atualmente e pode ser avaliado por várias técnicas empregando:

- *Fotometria*, que consiste em um método de baixo custo, eficiente, relativamente rápido e está baseado na absorção de luz na região espectral do substrato ou produto formado durante a reação catalisada.
- *Fluorimetria*, similar à metodologia de fotometria. A diferença está no método de detecção do substrato consumido ou produto formado, em que estes devem apresentar características de absorverem e emitirem luz. A técnica é vantajosa por ser altamente sensível.
- *Titulação automática* é uma técnica eficiente, de baixo custo e muito utilizada quando a reação produz ou consome ácido ou base. Titula-se a solução de reação com ácido ou base mantendo-a em pH constante. A quantidade de ácido ou base consumida por unidade de tempo representa a reação catalítica enzimática.
- *Análise radiativa* é empregada quando o substrato é marcado com isótopo radioativo, o qual será perdido ou transferido durante a reação a ser estudada. Trata-se de uma técnica altamente sensível para análise de cinética enzimática, entretanto é necessário o cuidado com o manuseio e o descarte dos elementos radioativos.

Por outro lado, estão as reações que não permitem uma quantificação cinética pelos métodos convencionais como os citados acima, por apresentarem velocidades de reação altíssimas e neste caso requerem metodologias como:

- *Stopped Flow*, que permite a determinação da atividade enzimática em milissegundos, instante em que um detector mede a absorbância ou fluorescência do produto formado. A metodologia é simples, mas, no entanto, o equipamento é de alto custo.
- *Temperature Jump*, por meio de uma mudança rápida de temperatura do sistema induz a mistura da reação catalisada a atingir um novo equilíbrio químico, possibilitando a quantificação dos produtos formados durante este processo. Como no caso anterior, o equipamento para a realização deste tipo de análise é de alto custo.

Análise Quantitativa da Atividade Enzimática

A primeira etapa no processo de determinação da atividade enzimática é proceder para obter um extrato livre de células, de modo que a enzima desta amostra esteja na solução. A amostra consiste em todo o material biológico que contiver uma fonte abundante da enzima a ser analisada, podendo ser microrganismos, tecidos de plantas ou de animal como fígado, pulmão, ovário, músculo, cérebro.

Se a enzima estiver em meio de cultura de células ou de fluidos biológicos, normalmente não é necessário nenhum procedimento de extração. Mas, se estas enzimas estiverem compartimentalizadas ou fixadas em agrupamentos celulares, precisam ser liberadas por algum procedimento de extração. Estes procedimentos podem ser suaves, como, por exemplo, a lise osmótica efetuada em células vermelhas do sangue ou forte como os efetuados por sonificadores durante o rompimento de alguns tipos celulares.

Assim, para a obtenção de uma análise quantitativa da atividade de uma enzima é necessário saber:

- O procedimento de extração e/ou purificação da enzima;
- A estequiometria da reação catalisada;
- Garantir que a concentração de substrato ou de cosubstrato não seja o limitante da reação;
- Se a enzima requer adição de cofatores como um íon ou coenzima no meio de ensaio ou no tampão de extração;
- A dependência da enzima sob a concentração do cofator ou substrato;
- O pH ótimo da reação;
- A temperatura pela qual a enzima está estável e apresenta alta atividade;

- O procedimento para a determinação do aparecimento do produto ou do desaparecimento do substrato da reação.

Extração da Enzima

A extração da enzima é realizada na presença de um tampão denominado extração, cuja composição é importante para a manutenção da estrutura e função das enzimas que estão baseadas nas propriedades originais da proteína (Capítulos 17 e 18). O pH deste tampão é baseado na escala da estabilidade do pH da proteína e outras características, tais como força iônica, cátions divalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}), ou adição de agentes redutores (ditiotreitól ou β -mercaptoetanol), podem ser necessárias para manter a atividade enzimática. Em muitos dos procedimentos utiliza-se um detergente (Triton X-100, SDS) como um dos componentes do tampão de extração para favorecer a exposição da enzima no extrato, mas para muitas enzimas estes detergentes interferem no método de análise da atividade enzimática. Após o rompimento das células, as partículas celulares são removidas do extrato por centrifugação e o sobrenadante utilizado para os ensaios da atividade enzimática, sendo este purificado ou não.

As enzimas são encontradas na natureza em misturas complexas. Geralmente dentro das células apresentam centenas de diferentes enzimas e, no entanto, em várias circunstâncias deve-se purificar a enzima a ser estudada. Em alguns casos é possível, por meio da aplicação de métodos específicos, utilizar enzimas no estado impuro, denominado de extrato bruto ou extrato cru, como vem sendo utilizado por De Melo et al., 1998 e 2004; por Pithon-Curi et al., 2004; por Chaible et al. 2005; e por Lins et al., 2006, mas na maioria das aplicações a presença de outras enzimas interfere na reação catalisada, desviando as reações específicas.

A utilização do extrato bruto para avaliar a atividade máxima de enzimas garante uma metodológica rápida, mas, no entanto, sua limitação está na instabilidade da enzima no meio de extração, sendo que as determinações de atividade precisam ser realizadas no mesmo dia da extração ou em alguns casos, como o da superóxido dismutase, no dia posterior a sua extração.

Durante o procedimento de obtenção do extrato da amostra, liberam-se também as proteases (enzimas que degradam proteínas) dos compartimentos intracelulares, que podem danificar a enzima desejada. Duas estratégias são utilizadas para impedir que as proteases digiram as proteínas da amostra:

1. Manter o extrato sob refrigeração. A atividade de enzimas proteolíticas é reduzida extremamente quando o extrato é mantido a 4°C. Para esta razão, o processo de extração é efetuado em amostras sob gelo e o processo da purificação da proteína é conduzido frequentemente em câmaras frias. No procedimento de sonicação, em que gera muito calor, é necessário usar um banho de gelo e etanol para preservar a enzima contra a ação das proteases e também para que não ocorra a desnaturação proteica, inclusive da enzima desejada.
2. Utilizar inibidores de proteases no meio de extração para impedir a degradação da enzima pelas proteases. O inconveniente desta estratégia é que os inibidores devem, eventualmente, ser removidos junto com outros interferentes.

Unidade de Atividade Enzimática

De acordo com a Comissão de Enzimas (CE), da IUBMB, uma unidade internacional (UI) de atividade enzimática é definida como sendo a quantidade de enzima que causa transformação de um micromol de substrato ou a quantidade de produto formado, dado em micromol, por minuto, sob condições ótimas. A atividade específica é o número de unidade de enzimas por miligrama de proteína. Por meio da atividade específica, temos a pureza da enzima.

A atividade molar ou molecular ou número de *turnover* expressa o número de moléculas do substrato transformado por uma única molécula de enzima ou único sítio de ligação em um minuto, quando a enzima está no valor-limite. A atividade molar pode ser calculada pela velocidade máxima.

Outra forma de expressar os valores da atividade enzimática é a unidade internacional determinada pela “Comissão de Enzima” o *katal*, o qual é definido como a transformação do substrato em mol por segundo.

Cuidados na Determinação da Atividade Enzimática

Vários cuidados devem ser tomados para evitar erros nas análises de determinação da atividade enzimática relacionados a:

Coleta das Amostras

Recomenda-se coletar duas ou três amostras idênticas para eventual repetição das análises.

- As amostras de tecidos animais devem ser coletadas imediatamente ao seu abate ou sacrifício. Estas

amostras devem ser divididas em pequenas quantidades (0,2 a 1,0 g) e acondicionadas em papel-alumínio devidamente etiquetado e mantidos sob nitrogênio líquido até o momento do armazenamento.

- As células e os microrganismos deverão ser isolados do meio de cultura por centrifugação, lavados por três vezes com PBS e armazenados na forma de *pellet* em tubos etiquetados.

Armazenamento das Amostras

As amostras de tecidos, de microrganismo ou de células são armazenadas em nitrogênio líquido ou em *freezer* a -80°C. Se a armazenamento for em nitrogênio líquido, é recomendável utilizar tubos criogênicos para evitar a perda de amostras devido ao rompimento dos tubos inadequados.

Tempo de Armazenamento das Amostras

As enzimas das células ou dos tecidos armazenados sob nitrogênio líquido ou a -80°C mantêm suas atividades até três ou quatro meses após a coleta. É importante que estas amostras, uma vez degeladas, não sejam congeladas novamente. Ao passo que as enzimas extraídas deverão ser mantidas sob refrigeração (não congelar) e suas atividades determinadas quando em extrato bruto, salvo raras exceções.

Erros Experimentais

A concentração de substrato, a presença de cofatores e a força iônica no meio reacional devem ser respeitadas; é necessário adequar a quantidade de amostra no ensaio para evitar resultados incoerentes com os limites de resolução do equipamento ou com os princípios físicos que regem as técnicas, como, por exemplo, garantir que a medida de absorbância respeite a lei de Lambert-Beer (Capítulo 19); garantir a completa dissolução do substrato ou cofatores no meio reacional; garantir que o pH do meio reacional seja o desejado; verificar a estabilidade dos reagentes; usar corretamente os acessórios dos equipamentos como cubetas e controlador de temperatura. Em caso de dúvida, procede-se à dosagem da atividade da enzima utilizando uma enzima-padrão de concentração conhecida.

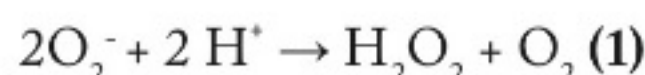
Como exemplo, descrevemos abaixo o procedimento para a determinação da atividade máxima das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione redutase.

Determinação da Atividade de Enzimas Antioxidantes por Técnicas Espectrofotométricas

As enzimas antioxidantes estão relacionadas com os mecanismos de defesa dos organismos aeróbios contra as espécies reativas de oxigênio, dentre elas temos:

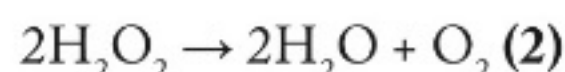
Superóxido Dismutase (SOD)

A enzima superóxido dismutase foi uma das primeiras enzimas antioxidantes a ser caracterizada por McCord e Fridovich ao final dos anos 1960. A SOD é responsável por eliminar o radical superóxido ou ânion superóxido (O_2^-), transformando-o em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Halliwell e Gutteridge, 2004), como mostra a equação 1:



Catalase

É a enzima que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em H_2O e O_2 (Halliwell e Gutteridge, 2004), como mostra a equação 2:



Glutathione Peroxidase e Glutathione Redutase

Agem em conjunto para eliminar os hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos como mostra a figura 35.1. A glutathione peroxidase (GPx) é largamente distribuída nos tecidos animais e age diretamente sobre os hidroperóxidos, H_2O_2 e ROOH. A atividade da glutathione peroxidase está relacionada ao consumo do cossustrato glutathione reduzida (GSH), que é convertido em glutathione oxidada (GSSG). A regeneração do GSH no meio celular é efetuada pela glutathione redutase (GR), tendo como participante o NADPH (Halliwell e Gutteridge, 2004).

A análise quantitativa da atividade máxima de uma enzima por espectrofotometria está baseada na absorção da luz visível ou ultravioleta pelo substrato ou pelo pro-

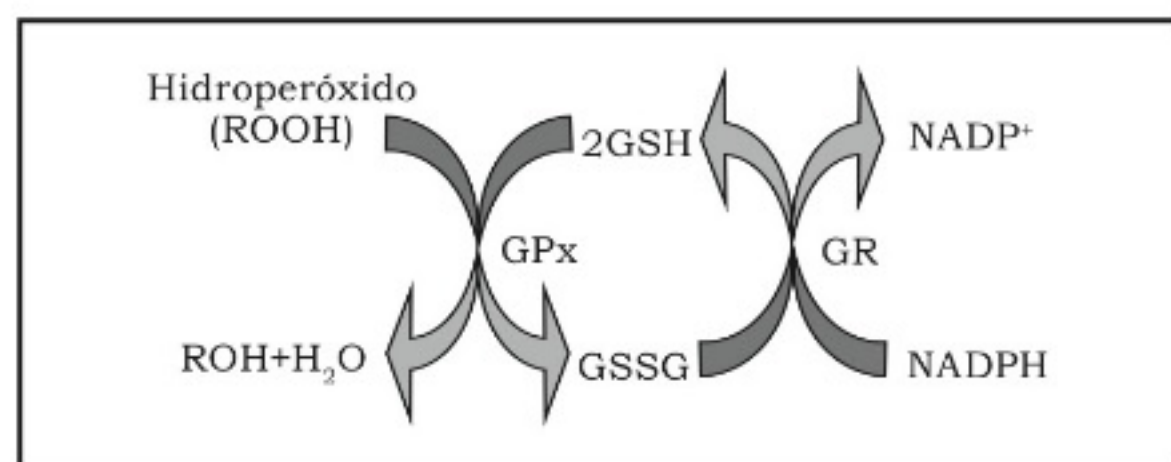


Figura 35.1 – Eliminação dos hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos.

duto da reação catalisada, avaliada em um comprimento de onda fixo. Para efetuar as análises, é necessário, como mencionado anteriormente, conhecer as características da enzima. Neste temos:

Características da Superóxido Dismutase

Abundante no citosol das células animais e portadora dos cofatores Cu^{2+} e o Zn^{2+} a superóxido dismutase, é denominada de CuZn-SOD, presente também nos lisossomos, peroxissomos, núcleo e no espaço entre a membrana interna e externa da mitocôndria. A CuZn-SOD está presente em baixas concentrações nas células procarióticas, como em bactérias e cianobactérias. Razoavelmente estável ao tratamento de extração e de purificação e quando comparada a outras enzimas, a CuZn-SOD possui considerável resistência ao calor, ao ataque por protease a aos agentes desnaturantes como cloreto de guanidina, sulfato de sódio dodecila (SDS) e ureia (Fridovich, 1995).

Uma característica importante das isoenzimas CuZn-SOD é a inibição por íons cianeto (CN^-) e por dietilditiocarbamato (Halliwell e Gutteridge, 2004), um composto que se liga ao cobre removendo-o da estrutura proteica.

Outra forma da superóxido dismutase é a Mn-SOD, que apresenta Mn^{3+} em sua estrutura largamente distribuída nas bactérias, plantas e animais. Em muitos tecidos animais e em microrganismos, a Mn-SOD encontra-se localizada na mitocôndria. Ao contrário da CuZn-SOD, a Mn-SOD é uma enzima sensível aos métodos de extração e de purificação. A Mn-SOD sofre desnaturação pelo calor e por agentes químicos como os detergentes e em muitos casos chega a ponto de ser completamente destruída, por exemplo, diante do tratamento com clorofórmio e etanol (Halliwell e Gutteridge, 2004).

Características da Catalase

A catalase está presente nas células aeróbias dos animais, das plantas, de diversos parasitas e de alguns microrganismos. Atividade de catalase nos tecidos dos animais e das plantas refere-se basicamente aos peroxissomos.

A catalase possui em sua estrutura o Fe^{3+} , importante para efetuar a reação catalítica. Alguns microrganismos contêm pseudocatalase, enzima que degrada o H_2O_2 contendo manganês em sua estrutura (Halliwell e Gutteridge, 2004).

A dificuldade no método de quantificação da atividade máxima da catalase está em encontrar o estado estacionário, uma vez que a concentração do substrato, o H_2O_2 , diminui drasticamente ao iniciar a reação.

A catalase é inibida por agentes como a azida, o cianeto e o ácido hipocloroso, mas possui um inibidor específico, o aminotriazol, que age modificando a estrutura do aminoácido histidina (Darr e Fridovich, 1986).

Características da Glutathione Peroxidase e da Glutathione Redutase

As enzimas citosólicas, glutathione peroxidase e a glutathione redutase, estão presentes nos animais e em algumas espécies de bactérias, fungos e algas. Entretanto, normalmente, não estão presentes nas plantas superiores e em muitas bactérias (Halliwell e Gutteridge, 2004).

A glutathione peroxidase possui quatro subunidades protéicas e em cada uma delas se encontra um átomo de selênio como cofator. Já a glutathione redutase possui duas subunidades proteicas, ligadas à flavina adenina dinucleotídeo (FAD). A atividade destas enzimas pode ser inibida pela presença de mercaptoderivados (Chaudiere et al., 1984).

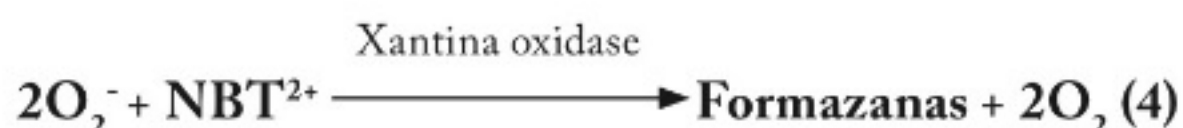
Procedimento Experimental para Extração das Enzimas Antioxidantes

A determinação da atividade máxima da SOD, CAT, GPx e GR é efetuada no extrato bruto obtido de tecidos ou de células (De Melo et al., 1998 e 2004; Pithon-Curi et al., 2004; Chaible et al., 2005; Lins et al., 2006). Para tal, os tecidos são triturados em homogeneizador de alta velocidade durante 2 minutos, na proporção de 1 g de tecido para 10 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, gelado (4,0°C). As células são rompidas em disruptor de células tipo sonicator na proporção de $1,0 \times 10^7$ células para 250 μL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, gelado (4°C). O extrato livre de células é obtido por centrifugação a 8.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante é retirado, cuidadosamente, com uma pipeta de Pasteur e transferido para tubos sob gelo e é, então, utilizado para determinar a atividade máxima das enzimas.

Procedimento Experimental para Determinar a Atividade Máxima da Superóxido Dismutase

A atividade máxima da SOD pode ser determinada de acordo a taxa de redução do *nitro blue tetrazolium*

(NBT) pelo ânion superóxido, a 25 °C, acompanhada por espectrofotometria a 550nm, como descrito por Beauchamp e Fridovich (1971) e empregada por De Melo et al., 1998 e 2004; Pithon-Curi et al., 2004; Chaible et al., 2005 e Lins et al., 2006. Nesta metodologia, o sistema xantina-xantina oxidase é utilizado como fonte geradora de ânion superóxido (O_2^-) (equação 3). O O_2^- gerado por este sistema reduz o NBT transformando-o em formazanas (equação 4). A SOD presente na amostra competirá pelo O_2^- (equação 1), inibindo a taxa de redução do NBT por este ânion. O meio de ensaio conterá NBT (0,10 mmol . L^{-1}), xantina (0,050 mmol . L^{-1}), EDTA (0,10 mmol . L^{-1}), xantina oxidase (0,013 UI) e tampão fosfato de sódio e potássio (53 mmol . L^{-1} , pH 7,8).



Neste ensaio, o primeiro passo é adequar a quantidade de xantina oxidase necessária para que a redução do NBT pelo O_2^- seja igual a 0,030 unidade de absorbância por minuto na ausência da amostra (SOD). O segundo passo é adequar a diluição da amostra para que a redução do NBT pelo O_2^- seja inibida pela SOD em um valor correspondente entre 20 e 40%. A diluição da amostra é realizada em tampão fosfato de sódio 10 mmol . L^{-1} , pH 7,4. No final do experimento, os cálculos da atividade máxima da SOD são realizados com base na seguinte definição: uma unidade da enzima corresponde a 50% de inibição da taxa de redução do NBT (Halliwell e Gutteridge, 2004).

Reagentes

- Fosfato de sódio dibásico.
- Fosfato de potássio monobásico.
- Hidróxido de potássio (KOH).
- Ácido clorídrico (HCl).
- Xantina.
- Hidróxido de sódio (NaOH).
- Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA).
- Nitro azul de tetrazólio (NBT).
- Xantina oxidase.

Soluções

Solução de fosfato de sódio dibásico 53 mmol . L^{-1}

Dissolver em um béquer de 500 mL 3,76 g de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) em 300 mL de água

ultrapura, transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL e completar o volume com água ultrapura. Armazenar em frasco de vidro âmbar a 4°C.

Solução de fosfato de potássio monobásico 53 mmol . L⁻¹

Dissolver em um béquer de 500 mL 3,6 g de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) em 300 mL de água ultrapura, transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL e completar o volume com água ultrapura. Armazenar em frasco de vidro âmbar a 4°C.

Tampão fosfato de sódio e potássio 53 mmol . L⁻¹ pH 7,8

Misturar 182,8 mL da solução de fosfato de sódio dibásico 53 mmol . L⁻¹ com 17,2 mL da solução de fosfato de potássio monobásico 53 mmol . L⁻¹. Verificar o pH e corrigir para 7,8 se necessário, utilizando solução de KOH 2 mol . L⁻¹ ou HCl 12 N. Armazenar em frasco de vidro âmbar a 4°C.

Solução de xantina 5 mmol . L⁻¹

Diluir 0,0015 g de xantina em 100 µL de NaOH 100 mmol . L⁻¹ e completar o volume para 2 mL com tampão fosfato de potássio 53 mmol . L⁻¹, pH 7,8. Armazenar em frasco de vidro a 4°C, por no máximo 8 dias.

Solução de EDTA 10 mmol . L⁻¹

Diluir 0,0372 g de EDTA em 10 mL de água ultrapura. Armazenar em frasco de vidro âmbar a 4°C.

Solução de NBT 10 mmol . L⁻¹

Diluir 0,0041 g de NBT em 500 µL de água ultrapura. Esta solução deverá ser preparada na hora do uso e mantida em gelo.

Metodologia

Calibração

Calibrar o espectrofotômetro com tampão fosfato de sódio e potássio 53 mmol . L⁻¹ pH 7,8, em 550 nm usando uma cubeta de quartzo.

Ensaio

Em duas cubetas de quartzo adicionar: 960 µL de tampão fosfato de sódio e potássio 53 mmol . L⁻¹, pH 7,8, 10 µL de xantina 5 mmol . L⁻¹, 10 µL de EDTA 10 mmol . L⁻¹, 10 µL de NBT 10 mmol . L⁻¹.

Na primeira cubeta acrescentar 10 µL de água ultrapura (branco), na segunda cubeta 10 µL da amostra (diluir se necessário) e acrescentar em ambas as cubetas 1 µL de xantina oxidase (10,4 UI/mL).

Misturar e realizar a leitura em espectrofotômetro, 550 nm, por 3 minutos, com intervalos de 30 segundos a 25°C. O valor da absorbância final (A_f) subtraído do valor da absorbância inicial (A_i) dá o valor de ΔA, que dividido pelo tempo de acompanhamento da reação (3 minutos) corresponderá ao ΔA/min. Este valor será utilizado para a realização dos cálculos da atividade enzimática.

Determinação do Teor de Proteínas nas Amostras

Verificar procedimentos no capítulo 20.

Cálculos

O procedimento para calcular a atividade máxima da superóxido dismutase, expressa em µmol de O₂⁻ consumido por minuto por miligrama de proteína presente na amostra, encontra-se descrito abaixo:

$$(\% \text{ de inibição}) = \frac{\Delta A/\text{min do branco} - \Delta A/\text{min da amostra} \times 100}{\Delta A/\text{min do branco}}$$

$$\text{SOD } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) =$$

$$\left(\frac{\% \text{ inibição} \times \text{diluição da amostra}}{50} \right) / \text{vol. da amostra (mL)}$$

$$\text{SOD } (\mu\text{mol}/\text{min por mg de proteína}) = \frac{\text{resultado } \Delta\text{mol}/\text{min}/\text{mL}}{\text{proteína da amostra mg/mL}}$$

Procedimento Experimental para Determinar a Atividade Máxima da Catalase

A atividade máxima da catalase normalmente é avaliada pelo consumo de peróxido de hidrogênio espectralometria a 240 nm e 25°C, por Beers e Sizer (1952) e empregada por De Melo et al., 1998 e 2004; Pithon-Curi et al., 2004; Chaible et al., 2005; e Lins et al., 2006. O meio de ensaio é composto por tampão fosfato de potássio (50 mmol . L⁻¹) e peróxido de hidrogênio (10 mmol . L⁻¹). A reação é iniciada pela adição da amostra e acompanhada durante 3 minutos. A reação química que corresponde a esta metodologia é similar à do sistema biológico (equação 2).

Reagentes

- Fosfato de potássio dibásico.
- Fosfato de potássio monobásico.
- Peróxido de hidrogênio a 30% (H_2O_2).
- Hidróxido de potássio (KOH).
- Ácido clorídrico (HCl).

Soluções

Solução de fosfato de potássio dibásico 200 mmol . L⁻¹

Dissolver em um béquer de 500 mL 22,82 g de fosfato de potássio dibásico ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) em 300 mL de água ultrapura, transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL e completar o volume com água ultrapura. Armazenar em frasco de vidro a 4°C.

Solução de fosfato de potássio monobásico 200 mmol . L⁻¹

Dissolver em um béquer de 500 mL 13,61 g de fosfato de potássio monobásico ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) em 300 mL de água ultrapura, transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL e completar o volume com água ultrapura. Armazenar em frasco de vidro âmbar a 4°C.

Tampão fosfato de potássio 100 mmol . L⁻¹, pH 7,0

Misturar 122 mL da solução de fosfato de potássio dibásico 200 mmol . L⁻¹ com 78 mL da solução de fosfato de potássio monobásico 200 mmol . L⁻¹ e acrescentar 200 mL de água ultrapura. Verificar o pH e corrigir para 7,0 se necessário, utilizando solução de KOH 2 mol . L⁻¹ ou HCl 12 N. Armazenar em frasco de vidro âmbar a 4°C.

Solução de H₂O₂ 20 mmol . L⁻¹

Diluir 1,1 mL de H_2O_2 a 30% com 498,9 mL de água ultrapura. Armazenar em frasco de vidro âmbar protegido da luz a 4°C.

Tampão fosfato de potássio 50 mmol.L⁻¹, pH 7,0, contendo H₂O₂ 10 mmol . L⁻¹

Misturar 250 mL de tampão fosfato de potássio 100 mmol . L⁻¹, pH 7,0, com 250 mL da solução de H_2O_2 20 mmol . L⁻¹. Armazenar em frasco de vidro âmbar protegido da luz a 4°C. Esta solução é denominada de mistura de ensaio.

Metodologia

Calibração

Calibrar o espectrofotômetro com água ultrapura em 240 nm usando uma cubeta de quartzo.

Verificação da concentração de H₂O₂ presente na mistura de ensaio

Adicionar 1 mL da mistura de ensaio em uma cubeta de quartzo e medir a absorbância a 240 nm (A_{240}). Calcular a concentração de H_2O_2 presente nesta solução (tampão fosfato de potássio 50 mmol . L⁻¹, pH 7,0) aplicando a absorbância na seguinte expressão:

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ (mmol . L}^{-1}\text{)} = 21,81 \times (A_{240} \text{ da mistura}) - 0,36$$

O valor da concentração de H_2O_2 deve estar próximo de 10 mmol . L⁻¹. Se necessário, ajustar este valor adicionando pequenas quantias da solução de H_2O_2 20 mmol . L⁻¹ ou do tampão fosfato de potássio 100 mmol . L⁻¹, pH 7,0.

Ensaio

Transferir 990 µL do tampão fosfato de potássio 50 mmol . L⁻¹, pH 7,0, contendo H_2O_2 10 mmol . L⁻¹ para uma cubeta de quartzo, adicionar 10 µL da amostra (diluir se necessário), misturar, esperar 30 segundos e realizar leitura em espectrofotômetro, a 240 nm, por 3 minutos, com intervalos de 30 segundos à temperatura de 25°C. O valor da absorbância final (A_f) subtraído do valor da absorbância inicial (A_i) dá o valor de ΔA , que dividido pelo tempo de acompanhamento da reação (3 minutos) corresponderá ao $\Delta A/\text{min}$. Este valor será utilizado para a realização dos cálculos da atividade enzimática.

Determinação do Teor de Proteínas nas Amostras

Verificar procedimentos no capítulo 20.

Cálculos

O procedimento para calcular a atividade máxima da catalase, expressa em mmol de H_2O_2 , consumido por minuto por miligrama de proteína presente na amostra, encontra-se descrito abaixo:

Catalase (mmol/min/mL)

$$\frac{\Delta A/\text{min} \times \text{volume da cubeta (mL)} \times \text{diluição da amostra}}{43,6 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1} \times \text{volume da amostra do ensaio (ml)}}$$

$$\text{Catalase (mmol/min por mg de proteína)} = \frac{\text{resultado mmol/min/mL}}{\text{proteína da amostra mg/mL}}$$

Procedimento Experimental para Determinar a Atividade Máxima da Glutational Peroxidase

A atividade máxima da glutational peroxidase pode ser determinada por espectrofotometria com base no decréscimo da concentração de NADPH em 340 nm

a 37°C, como descrito por Paglia et al. (1967) e empregada por De Melo et al., 1998 e 2004; Pithon-Curi et al., 2004; Chaible et al., 2005; e Lins et al., 2006. Resumidamente, nesta metodologia temos o meio reacional constituído de tampão fosfato de potássio (100 mmol . L⁻¹, pH 7,0) contendo EDTA (3 mmol . L⁻¹), glutathiona redutase (0,3 UI), NADPH (0,1 mmol . L⁻¹), GSH (2 mmol . L⁻¹), azida de sódio (1 mmol . L⁻¹) e cumeno hidroperóxido (0,02%). A reação é iniciada pela adição de cumeno hidroperóxido e acompanhada por 3 minutos a 37°C. A reação química que corresponde a esta metodologia é similar à do sistema biológico em que o cumeno hidroperóxido é reduzido ao álcool correspondente gerando glutathiona oxidada (GSSG).

Reagentes

- Fosfato de potássio dibásico.
- Fosfato de potássio monobásico.
- Hidróxido de potássio (KOH).
- Ácido clorídrico (HCl).
- Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA).
- Tris (hidroximetil) aminometano (Tris).
- β-Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato forma reduzida (NADPH).
- Glutathiona forma reduzida (GSH).
- Glutathiona redutase (GR).
- Azida de sódio.
- Cumeno hidroperóxido.

Soluções

Solução de fosfato de potássio dibásico 200 mmol . L⁻¹

Dissolver em um béquer de 500 mL 22,82 g de fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄ • 3H₂O) em 300 mL de água ultrapura, transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL e completar o volume com água ultrapura. Armazenar a solução em frasco de vidro âmbar a 4°C.

Solução de fosfato de potássio monobásico 200 mmol . L⁻¹

Dissolver em um béquer de 500 mL 13,61 g de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄ • 3H₂O) em 300 mL de água ultrapura, transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL e completar o volume com água ultrapura. Armazenar a solução em frasco de vidro âmbar a 4°C.

Tampão fosfato de potássio 100 mmol . L⁻¹, pH 7,0 contendo EDTA 3 mmol . L⁻¹

Misturar 46,5 mL da solução de fosfato de potássio dibásico 200 mmol . L⁻¹ com 203,5 mL da solução de fosfato de potássio monobásico 200 mmol . L⁻¹, acrescentar 0,5584 g de EDTA e 250 mL de água ultrapura. Verificar o pH e corrigir para 7,0 se necessário, utilizando solução de hidróxido de potássio 2 mol . L⁻¹ ou ácido clorídrico 12 N. Armazenar em frasco de vidro âmbar a 4°C.

Tampão tris-HCl 100 mmol . L⁻¹, pH 7,0

Dissolver em um béquer de 100 mL 0,1210 g de Tris em 80 mL de água ultrapura, ajustar o pH para 7,0 com ácido clorídrico 12 N, transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água ultrapura. Armazenar em frasco de vidro âmbar a 4°C.

Solução de NADPH 20 mmol . L⁻¹

Diluir 0,0083 g de NADPH em 500 µL de tampão tris-HCl 100 mmol . L⁻¹, pH 7,0. Esta solução deverá ser preparada na hora do uso e mantida em gelo.

Solução de GSH 100 mmol . L⁻¹

Diluir 0,0307 g de GSH em 1.000 µL de água ultrapura. Esta solução deverá ser preparada na hora do uso e mantida em gelo.

Solução de azida de sódio 100 mmol . L⁻¹

Diluir 0,0650 g de azida de sódio em 10 mL de água ultrapura. Armazenar em frasco de vidro a 4°C.

Solução de cumeno hidroperóxido

Diluir 22 µL de cumeno hidroperóxido a 88% em 978 µL de água ultrapura. Esta solução deverá ser preparada na hora do uso e mantida em gelo.

Metodologia

Calibração

Calibrar o espectrofotômetro com tampão fosfato de potássio 100 mmol . L⁻¹, pH 7,0, contendo EDTA 3 mmol . L⁻¹ em 340 nm a 37°C usando uma cubeta de quartzo.

Ensaio

Em duas cubetas de quartzo adicionar: 945 µL de tampão fosfato de potássio 100 mmol . L⁻¹, pH 7,0 contendo EDTA 3 mmol . L⁻¹, 1 µL de glutathiona redutase (297,6 UI/mL), 5 µL de NADPH 20 mmol . L⁻¹, 20 µL de GSH 100 mmol . L⁻¹ e 10 µL de azida de sódio 100 mmol . L⁻¹.

Na primeira cubeta acrescentar 10 µL de água ultrapura e na segunda 10 µL da amostra (diluir se necessário), misturar e deixar em repouso por 5 minutos a 30°C. Em seguida acrescentar em ambas as cubetas 10 µL da solução de cumeno hidroperóxido.

Misturar e realizar leitura em espectrofotômetro, 340 nm, por 3 minutos, com intervalos de 30 segundos a 37°C. O valor da absorbância final (A_f) subtraído do valor da absorbância inicial (A_i) dá o valor de ΔA , que dividido pelo tempo de acompanhamento da reação (3 minutos) corresponderá ao $\Delta A/\text{min}$. Este valor será utilizado para a realização dos cálculos da atividade enzimática.

Determinação do Teor de Proteínas nas Amostras

Verificar procedimentos no capítulo 20.

Cálculos

O procedimento para calcular a atividade máxima da glutathiona peroxidase, expressa em µmol de NADPH consumido por minuto por miligrama de proteína presente na amostra, encontra-se descrito abaixo:

$GPx (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) =$

$$\frac{\Delta A/\text{min} \times \text{volume da cubeta (mL)} \times \text{diluição da amostra}}{6,22 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1} \times \text{volume da amostra do ensaio (mL)}}$$

$$GPx (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg de proteína}) = \frac{\text{resultado } \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}}{\text{proteína da amostra mg/mL}}$$

Procedimento Experimental para Determinar a Atividade Máxima da Glutathiona Redutase

A atividade máxima da glutathiona redutase pode ser determinada por espectrofotometria com base no decréscimo da concentração de NADPH em 340 nm a 25°C como descrito por Carlberg e Mannervick (1985) e empregada por De Melo et al., 1998 e 2004; Pithon-Curi et al., 2004; Chaible et al., 2005; e Lins et al., 2006. Resumidamente, nesta metodologia temos o meio reacional constituído de tampão fosfato de potássio (100 mmol . L⁻¹, pH 7,0) contendo EDTA (1 mmol . L⁻¹), NADPH (0,1 mmol . L⁻¹), GSSG (1 mmol . L⁻¹). A reação é iniciada pela adição da amostra e acompanhada por 3 minutos a 25°C. A reação química correspondente a esta metodologia é similar à dos sistemas biológicos (esquema 2, parte referente a GR), em que a glutathiona oxidada (GSSG) é convertida em glutathiona reduzida (GSH).

Reagentes

- Fosfato de potássio dibásico.
- Fosfato de potássio monobásico.
- Hidróxido de potássio (KOH).
- Ácido clorídrico (HCl).
- EDTA.
- Tris.
- NADPH.
- Glutathiona forma oxidada (GSSG).

Soluções

Solução de fosfato de potássio dibásico 400 mmol . L⁻¹

Dissolver em um béquer de 500 mL 45,68 g de fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄ • 3H₂O) em 300 mL de água ultrapura, transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL e completar o volume com água ultrapura. Armazenar a solução em frasco de vidro âmbar a 4°C.

Solução de fosfato de potássio monobásico 400 mmol . L⁻¹

Dissolver em um béquer de 500 mL 27,2 g de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) em 300 mL de água ultrapura, transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL e completar o volume com água ultrapura. Armazenar a solução em frasco de vidro âmbar a 4°C.

Tampão fosfato de potássio 200 mmol . L⁻¹, pH 7,0, contendo EDTA 2 mmol . L⁻¹

Misturar 76,25 mL da solução de fosfato de potássio dibásico 400 mmol . L⁻¹ com 48,75 mL da solução de fosfato de potássio monobásico 400 mmol . L⁻¹, acrescentar 0,1860 g de EDTA e 100 mL de água ultrapura. Verificar o pH e corrigir para 7,0 se necessário, utilizando solução de hidróxido de potássio 2 mol . L⁻¹ ou ácido clorídrico 12 N e completar o volume para 250 mL com água ultrapura. Armazenar em frasco de vidro âmbar a 4°C.

Tampão Tris-HCl 100 mmol.L⁻¹ pH 7,0

Dissolver em um béquer de 100 mL 0,1210 g de tris em 80 mL de água ultrapura, ajustar o pH para 7,0 com ácido clorídrico 12 N, transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água ultrapura. Armazenar em frasco de vidro âmbar a 4°C.

Solução de NADPH 20 mmol . L⁻¹

Diluir 0,0083 g de NADPH em 500 µL de tampão tris-HCl 100 mmol . L⁻¹, pH 7,0. Esta solução deverá ser preparada na hora do uso e mantida em gelo.

Solução de GSSG 20 mmol . L⁻¹

Diluir 0,0124 g de GSSG em 1.000 µL de água ultrapura. Esta solução deverá ser preparada na hora do uso e mantida em gelo.

Metodologia*Calibração*

Calibrar o espectrofotômetro com 500 µL de tampão fosfato de potássio 200 mmol . L⁻¹, pH 7,0, contendo EDTA 2 mmol . L⁻¹ diluído com 500 µL de água ultrapura em 340 nm a 25°C usando uma cubeta de quartzo.

Ensaio

Em uma cubeta de quartzo adicionar: 500 µL de tampão fosfato de potássio 200 mmol . L⁻¹, pH 7,0, contendo EDTA 2 mmol . L⁻¹, 435 µL de água ultrapura, 5 µL de NADPH 20 mmol . L⁻¹, 50 µL de GSSG 20 mmol . L⁻¹ e 10 µL de amostra.

Misturar e realizar a leitura em espectrofotômetro, 340 nm, por 3 minutos, com intervalos de 30 segundos a 25°C. O valor da absorbância final (A_f) subtraído do valor da absorbância inicial (A_i) dá o valor de ΔA, que dividido pelo tempo de acompanhamento da reação (3 minutos) corresponderá ao ΔA/min. Este valor será utilizado para a realização dos cálculos da atividade enzimática.

Determinação do teor de proteínas nas amostras

Verificar procedimentos no capítulo 20.

Cálculos

O procedimento para calcular a atividade máxima da glutathione redutase, expressa em µmol de NADPH consumido por minuto por miligrama de proteína presente na amostra, encontra-se descrito abaixo:

$$GR (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) =$$

$$\frac{\Delta A/\text{min} \times \text{volume da cubeta (mL)} \times \text{diluição da amostra}}{6,22 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1} \times \text{volume da amostra do ensaio (mL)}}$$

$$GR (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg de proteína}) = \frac{\text{resultado } \Delta\text{mol}/\text{min}/\text{mL}}{\text{proteína da amostra mg/mL}}$$

Referências

- Beauchamp, C.; Fridovich, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 44(1):276-287, 1971.
- Beers, R.F.; Sizer, I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.*, 195(1):133-140, 1952.
- Carlberg, I.; Mannervik, B. Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*, 113. New York: Academic Press, 1985. pp. 484-490.
- Chaible, L.M.; Alba, T.C.; Maia, A.A.M.; Pugine, S.M.P.; Gilli, M.R.M.S.; Vale, C.R.; Boschini, C.; Pithon-Curi, T.C.; Curi, R.; De Melo, M.P. Effect of *Cysticercus cellulosae* on neutrophil function and death. *Vet. Parasitol.*, 127(2):121-129, 2005.
- Chaudiere, J.; Wilhelmsen, E.C.; Tappel, A.L. Mechanism of selenium-glutathione peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acids and other mercaptans. *J. Biol. Chem.*, 259(2):1043-1050, 1984.
- Darr, D.; Fridovich, I. Irreversible inactivation of catalase by 3-amino-1,2,4-triazole. *Biochem. Pharmacol.*, 35(20):3642, 1986.
- De Melo M.P.; Pithon-Curi T.C.; Miyasaka, C.K.; Palanch, A.P.; Curi, R. effect of indole acetic acid on oxygen metabolism in cultured Rat. neutrophil. *Gen. Pharmacol.*, 31(4):573-577, 1998.
- De Melo, M.P.; Pithon-Curi, T.C.; Curi, R. Indole-3-acetic acid increases glutamine utilization by high peroxidase activity-presenting leukocytes. *Life Scie.*, 75:1713-1725, 2004.
- Fridovich, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Ann. Rev. Biochem.*, 64:97, 1995.
- Halliwell, B.; Gutteridge, M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. New York: Oxford University Press Inc., 2004.
- Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. Princípios de Bioquímica, São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda, 2000.
- Lins, P.G.; Valle, C.R.; Pugine, S.M.P.; Oliveira, D.L.; Ferreira, M.S.L.; Costa, E.J.X.; De Melo, M.P. Effect of indole acetic acid administration on the neutrophil functions and oxidative stress from neutrophil, mesenteric lymph node and liver. *Life Scie.* 78:564-570, 2006.
- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). <http://www.chem.qmul.ac.uk>, acessado em 4 de agosto de 2006.
- Paglia, D.E.; Valentine, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, 70(1):158-169, 1967.
- Pithon-Curi, T.C.; De Melo, M.P.; Curi, R. Glucose and glutamine utilization by rat lymphocytes, monocytes and neutrophils in culture: a comparative study. *Cell Biochem. Funct.*, 22(5):1-6, 2004.

36. Análise do Metabolismo de Células de Mamíferos Usando Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Lorraine Brennan
Philip Newsholme

Introdução

No começo do século XX, sondas marcadas com radiatividade ou marcadores não radiativos passaram a ser utilizados em estudos biológicos. No início, os marcadores radiativos tinham a desvantagem de apresentar meia-vida muito curta (minutos a horas). Após a Segunda Guerra Mundial, estudos usando ^{14}C como marcador tornaram-se muito comuns, permitindo a análise detalhada de vias metabólicas complexas. Entretanto, a necessidade de diluição do marcador radiativo e o uso restrito de isótopos radiativos limitaram o uso de tais marcadores. Por outro lado, isótopos estáveis em conjunto com a espectroscopia da ressonância magnética nuclear (RMN) passaram a ser utilizados nos estudos metabólicos. Essa técnica não invasiva permitiu a quantificação precisa do fluxo de metabólitos. A espectroscopia da RM pode ser usada *in vitro* e *in vivo* e recebeu grande atenção nos últimos 30 anos.

Introdução Básica à Espectroscopia da RM

Uma descrição completa da espectroscopia da RM vai muito além do que está sendo apresentado neste capítulo. Apenas os princípios básicos serão apresentados aqui e o leitor poderá encontrar descrições mais detalhadas em textos anteriormente publicados (Markley e Opella 1997; Balci, 2005; Derome, 1987; Gunther, 1995).

Uma propriedade intrínseca de alguns núcleos é a de possuir um *spin* denominado I . Pela análise quântica, sabemos que um núcleo de *spin* I terá $2I + 1$ orientações possíveis. Para *spin* $\frac{1}{2}$ núcleo, tais como ^1H , ^{31}P , ^{13}C e ^{15}N , têm-se duas orientações. Na ausência de um campo magnético externo, essas orientações terão energia igual. Quando um campo magnético externo é aplicado, a quantidade de energia é dividida. A distribuição do núcleo nesses níveis energéticos é descrita

pela distribuição de Boltzmann. O núcleo com rotação *spin* gerando um pequeno campo possui um momento magnético μ . A diferença de energia entre os dois níveis é dada por $E = h\nu$, onde h é a constante de Planck e ν é a frequência de Larmor. A frequência de Larmor depende da taxa giromagnética do núcleo (variável em núcleos diferentes) e a força do campo em relação ao núcleo: $\nu = \gamma B/2\pi$, onde B é a força do campo magnético.

A aplicação de um campo magnético oscilante induz transições entre níveis energéticos. A transferência de uma rede de *spins* para o nível superior resulta na absorção de energia e isso é, essencialmente, medido no espectrômetro. A informação é mostrada como um espectro no qual o eixo x é a frequência, e o eixo y , a intensidade. A frequência da ressonância depende do campo magnético aplicado. Essa frequência varia de um espectrômetro para outro. Como resultado, é comum expressar a frequência de cada pico em partes por milhão (ppm), que é independente do campo magnético usado no experimento. O novo termo é denominado troca química (δ) e é definido a seguir:

$$\delta = \frac{10^6 (\nu - \nu_{\text{ref}})}{\nu_{\text{ref}}}$$

onde ν_{ref} é a frequência operante do espectrômetro e ν a frequência de ressonância (pico).

Troca Química

O campo magnético do núcleo não é igual ao campo magnético aplicado. Os elétrons ao redor do núcleo protegem-no do campo aplicado. Cada núcleo em uma molécula é protegido em diferentes extensões, dependendo do local de distribuição do elétron. Esse efeito, chamado de troca química, é o que torna a espectroscopia da RMN atraente aos bioquímicos. Podemos distinguir, por exemplo, os três tipos de átomos de

fósforo presentes na molécula de ATP. Em resumo, a frequência de cada núcleo é mostrada no eixo x de um espectro da RMN típico e depende do ambiente químico. A troca química (ou frequência) de cada ressonância é expressa em partes por milhão (ppm) da frequência operante do espectrômetro.

Acoplamento *Spin-spin*

A troca química não é apenas uma informação disponível em um espectro da RMN. Uma outra forma valiosa de informação é o acoplamento *spin-spin*, que resulta na separação do espectro da RMN. O acoplamento *spin-spin* surge de interações magnéticas entre os núcleos e resulta na partição de sinais múltiplos.

Quantificação

A intensidade de um pico em um espectro é proporcional ao número de núcleos que dá origem a este. Consequentemente, é possível quantificar um certo metabólito em uma amostra. Entretanto, deve ser notado que a intensidade também é influenciada pelo tempo de relaxamento das ressonâncias. O tempo de relaxamento refere-se ao retorno dos *spins* excitados ao ponto de equilíbrio. Após a excitação, se não houver tempo suficiente para o relaxamento voltar ao estado inicial, então, na próxima excitação, o sinal tornar-se-á saturado e a intensidade do espectro será reduzida.

Núcleos mais Usados

Os núcleos mais usados nas análises do metabolismo de células de mamíferos são ^1H , ^{31}P , ^{13}C , ^{19}F e ^{23}Na . Os núcleos ^1H são comuns em moléculas biológicas, fazendo da RMN de ^1H uma ferramenta valiosa. Entretanto, o estreito limiar da troca química resulta em sobreposição de picos. Outro fator a ser considerado é a grande concentração de água nas amostras biológicas que pode cobrir picos de outras moléculas. Há uma variedade de técnicas disponíveis para suprimir o sinal de água. O isótopo ^{13}C é detectável por RMN, enquanto o isótopo ^{12}C não é. Os núcleos ^{13}C apresentam um amplo espectro de troca química com pouca sobreposição de picos, tornando o trabalho e a interpretação mais fáceis. O uso de ^{13}C é discutido em detalhes mais adiante. O isótopo naturalmente abundante do fósforo, ^{31}P , é detectável por RMN e amplamente usado para estudar o metabolismo energético em sistemas biológicos.

Uso de Espectroscopia da RMN de ^{13}C em Estudos Metabólicos

Nos últimos anos, tem ocorrido aumento no uso de espectroscopia da RMN de ^{13}C no estudo do metabolismo intermediário. Uma das principais características da espectroscopia da RMN de ^{13}C que distingue o carbono da RMN de ^1H é de que a ocorrência do ^{13}C na natureza é de apenas 1,1%. Como descrito acima, podemos extrair muitas informações sobre o metabolismo intermediário usando essa técnica. Para isso, o metabólito deve ser marcado. Primeiro, uma via em particular pode ser estudada pela incubação de células com um substrato marcado, escolhido previamente. Segundo, pela seleção criteriosa da posição marcada no metabólito, vias metabólicas alternativas podem ser estudadas. O espectro resultante contém picos bem definidos, que são facilmente assinalados, sem a necessidade de isolar os subprodutos. A principal desvantagem dessa técnica é a baixa sensibilidade, entretanto, nos anos recentes, devido ao desenvolvimento da tecnologia de sondas frias, este não é mais um problema.

Considerações Técnicas

Para o estudo do metabolismo intermediário usando espectroscopia da RMN de ^{13}C , o primeiro passo é decidir o substrato marcado, o qual depende da questão que se deseja responder. Alguns exemplos do tipo de informação que pode ser extraída do uso de vários substratos marcados são apresentados a seguir.

Na maioria dos estudos metabólicos descritos na literatura, nos quais foi utilizada a espectroscopia da RMN de ^{13}C , foram usados extratos de células ou tecidos cultivados. Geralmente, os extratos são preparados após incubação na presença de um substrato marcado. Há também exemplos nos quais o estudo foi realizado *in vivo* (ver revisão de Shulman e Rothman, 2001). Este capítulo, então, focará no trabalho onde foi usado extrato de células ou tecido cultivados.

A maioria dos átomos de carbono dos metabólitos apresenta pelo menos um próton ligado. Isso significa que o sinal de carbono aparecerá com dois picos, devido ao acoplamento entre próton e carbono (um *triplete* aparece no caso de dois prótons ligados). Na prática, esses prótons devem ser desacoplados para que se obtenha uma linha ampla e sensível.

Possíveis Destinos dos Metabólitos Provenientes da Glicose Marcada com ^{13}C

A glicose marcada com ^{13}C entra na célula e é metabolizada até piruvato marcado com ^{13}C , como mostrado na figura 36.1. Esse piruvato pode, então, entrar no ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo TCA) por duas vias: 1. via mediada pela piruvato desidrogenase (PDH) e 2. via mediada pela piruvato carboxilase (PC).

Para simplificar, consideraremos a glicose marcada apenas na posição C1. Ao entrar no ciclo do TCA na via mediada pela PDH, o α -cetogluturato é marcado na posição C4 que origina glutamato marcado na posição C4 na primeira volta do ciclo (este é definido com $[4\text{-}^{13}\text{C}]$ glutamato). Durante a segunda volta do ciclo, a marcação é embaralhada, originando oxaloacetato marcado em C2 e C3. Esse, então, pode condensar com acetil-CoA marcado para culminar com ^{13}C nas posições C2 e C4 e nas posições C3 e C4. Ao entrar no ciclo de Krebs via piruvato carboxilase, o oxaloacetato é marcado na posição C2. Essa marcação é embaralhada como resultado do equilíbrio entre oxaloacetato, malato e fumarato. Os isotopômeros de glutamato formados são glutamatos marcados nas posições C2 e C3.

A situação é mais complicada quando a glicose é uniformemente marcada com ^{13}C (Fig. 36.2). Ao entrar no ciclo de Krebs via PDH, o piruvato é convertido em acetil-CoA marcado nas posições 1 e 2 ($[1,2\text{-}^{13}\text{C}]$ acetil-CoA) seguido pela oxidação completa a CO_2 e H_2O . Essa via gera $[4,5\text{-}^{13}\text{C}]$ α -cetogluturato e subsequentemente $[4,5\text{-}^{13}\text{C}]$ glutamato. Então, dependendo do tipo celular, o glutamato pode ser metabolizado em $[1,2\text{-}^{13}\text{C}]$ GABA ou $[4,5\text{-}^{13}\text{C}]$ glutamina. Durante a segunda volta do ciclo do TCA, dois isotopômeros de glutamato serão formados devido ao embaralhamento da marcação nas reações reversíveis do ciclo do TCA. Entretanto, um padrão diferente de marcação ocorre se o piruvato entrar no ciclo de Krebs via piruvato carboxilase. Para simplificar, essa possibilidade não é mostrada na figura 36.2. A espectroscopia da RMN é particularmente adequada para a análise desses isotopômeros gerados, como descrito acima.

Como a concentração celular de α -cetogluturato é muito baixa para ser detectada por RMN, a análise dos isotopômeros é, normalmente, feita no glutamato. O glutamato está em equilíbrio rápido com o α -cetogluturato, consequentemente, assume-se que as populações de isotopômeros de glutamato refletem as de α -cetogluturato. O número máximo de marcação em uma molécula com

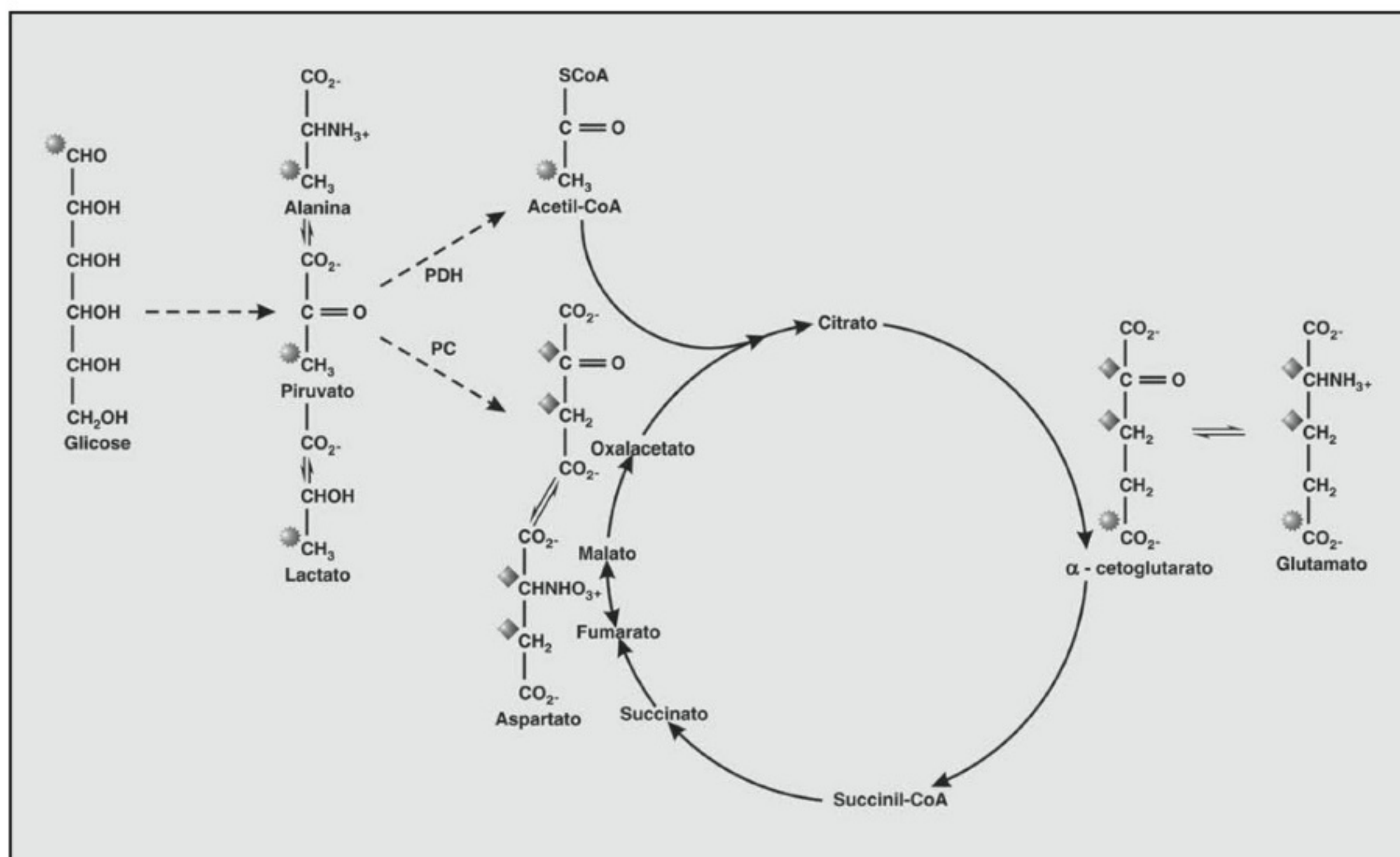


Figura 36.1-Diagrama da distribuição de ^{13}C marcado depois de um ciclo de TCA começando com $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ glicose.

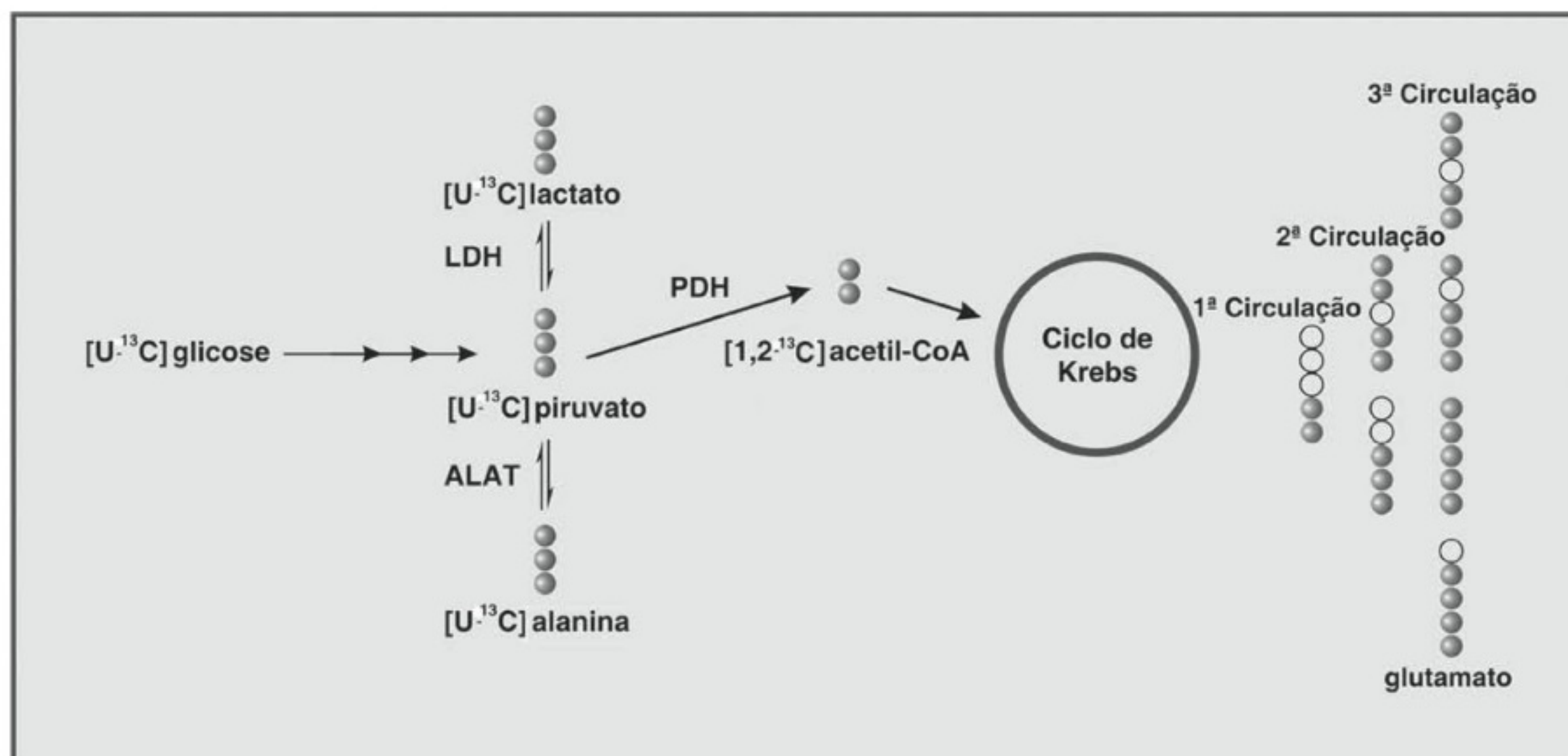


Figura 36.2 - Esquema simplificado do metabolismo de [U-¹³C] glicose. São mostrados isotopômeros de glutamato formados após entrada do piruvato via PDH. Para simplificar não são mostrados os isotopômeros formados na entrada do piruvato através de PC. Os isotopômeros estão limitados aqueles formados durante o primeiro, segundo e terceiro ciclo. ¹³C marcado é indicado por círculos cheios. LDH, Lactato desidrogenase; ALAT, alanina aminotransferase; PDH, piruvato desidrogenase.

n carbonos é 2ⁿ. Consequentemente, o glutamato tem potencialmente 32 isotopômeros. O enriquecimento relativo desses isotopômeros depende do sítio de enriquecimento e a atividade de cada via que alimenta o ciclo do TCA. Uma análise básica das populações de isotopômeros do glutamato permite determinar as vias metabólicas da glicose e o fluxo relativo através das vias oxidativa (PDH) e anaplerótica (PC).

Análise do Espectro da RMN de ¹³C

O primeiro passo na análise do espectro nos estudos metabólicos é a observação dos picos observados. A análise do pico assinalado pode ser feita com a ajuda das tabelas de troca química já publicadas (Fan, 1996) e, em alguns casos, pode ser realizada pela adição de um composto não marcado. Uma vez feita a análise do espectro, os dois tipos de informação podem ser extraídos. Primeiramente, a intensidade relativa dos diferentes sítios de carbono na molécula pode ser obtida e, segundo, a intensidade relativa de vários *multiplets* em uma ressonância pode ser determinada. A origem desses *multiplets* é explicada a seguir.

Quando o glutamato é marcado na posição C4, como ocorre no ciclo de Krebs, após a entrada do piruvato formado a partir de 1-¹³C glicose via PDH, há um único pico no espectro. Entretanto, se o glutamato é

também marcado na posição C3 adjacente, então, o sinal para C4 é dividido em dois sinais de igual intensidade devido ao acoplamento *spin-spin*. O tamanho desse acoplamento é referido como constante e é chamado de J_{34} . Se o glutamato estiver marcado nas posições C3, C4 e C5, o pico C4 aparece agora como quatro picos (um *doublet de doublets*), pois as constantes de acoplamento J_{34} e J_{45} são diferentes. Entretanto, se olharmos para o glutamato na posição C3, uma situação levemente diferente surge, pois as constantes de acoplamentos J_{23} e J_{34} são muito similares. Consequentemente, os dois *doublets* que surgem a partir de [2,3-¹³C] e [3,4-¹³C] glutamato na posição C3 não são *doublet de doublets*, mas um *triplet* (3 linhas). Em resumo, na posição C3 do glutamato, pode haver até 5 picos, resultantes de 3 isotopômeros diferentes e a concentração relativa desses três grupos pode ser determinada.

Exemplos do Uso da RMN de ¹³C em Estudos Metabólicos

Há muitos exemplos na literatura em que a RMN de ¹³C tem sido usada para avaliar processos metabólicos em células de mamíferos. Listaremos aqui alguns. Trabalho do nosso laboratório usando glicose mono-marcada ([1-¹³C] glicose) e alanina ([3-¹³C] alanina) permite compreender a relação entre o metabolismo e

a secreção de insulina na linhagem celular beta do pâncreas BRIN-BD11 (Brennan et al. 2002). A L-alanina é um potente secretagogo de insulina; 10 mM alanina induz aumento de $5\times$ acima dos valores basais. Nossos dados são sugestivos de que seu mecanismo de ação envolve o cotransporte com Na^+ , resultando em despolarização da membrana celular. Usando $[3\text{-}^{13}\text{C}]$ -alanina, demonstramos, pela primeira vez, que esse aminoácido é metabolizado nas células beta clonal (BRIN-BD11) e que o metabolismo oxidativo e o subsequente aumento de ATP são, de fato, importantes para a secreção de insulina. A L-alanina sinergicamente aumentou a secreção de insulina estimulada pela glicose em células BRIN-BD11. Também demonstramos que a L-alanina aumenta o metabolismo de glicose. O aumento da entrada de piruvato derivado de glicose no ciclo do TCA na presença de alanina pode resultar em elevação na geração de metabólitos-chave que regulam o processo de secreção de insulina.

Malloy et al. (1990) desenvolveram um programa de computador para auxiliar na análise dos isotopômeros de ^{13}C (tcacalc). Usando esse programa, os pesquisadores analisaram extratos de células INS (linhagem de célula beta do pâncreas) incubadas na presença de $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glicose e mostraram a existência de dois *pools* de piruvato (Lu et al., 2002). O uso de várias linhagens celulares responsivas à glicose indicou que a troca de piruvato por intermediários do ciclo do TCA foi correlacionada com a capacidade de secretar insulina.

Na área de neuroquímica, há muitos exemplos nos quais, a RMN de ^{13}C tem sido usada para o entendimento do metabolismo de astrócitos e neurônios e as trocas metabólicas entre eles. Em estudos recentes de RM foram elucidados a importância da alanina como fonte de nitrogênio em astrócitos e o papel de um *shuttle* lactato-alanina (Waagepetersen et al., 2000; Zwingmann et al., 2000). Usando uma série de componentes marcados, foi demonstrado que os neurônios glutamatérgicos produzem alanina usando nitrogênio da amônia originada da glutamina. A transferência de alanina aos astrócitos foi compensada pela do lactato aos neurônios.

Uso de Sistemas de Biorreator para Monitorizar o Metabolismo em Células Íntegras

A espectroscopia da RMN, combinada ao sistema de biorreator, permite estudar o metabolismo de células vivas. Em tais sistemas, as células são mantidas em alta

densidade e perfundidas sob condições bem definidas e controladas. A resposta metabólica a várias condições pode ser avaliada usando espectroscopia de RMN. Atualmente, não há um sistema disponível comercialmente que seja compatível com os estudos da RMN de rotina. Como resultado, a maioria dos laboratórios que desenvolve esses estudos desenha, constrói e otimiza seus próprios sistemas de biorreator.

Antes de continuarmos, queremos rever várias nomenclaturas que têm surgido nos últimos anos. Os primeiros estudos da RMN foram aplicados a sistemas vivos. Hoje, esse termo refere-se a estudos da RMN em humanos ou outros organismos multicelulares intactos. Enquanto usamos o termo “estudos de biorreatores” para se referir aos estudos da RMN com células intactas de mamíferos, também gostaríamos de lembrar ao leitor que, na literatura, sistemas similares são descritos pelos termos: estudos *in situ* e *on-line*.

Métodos para Obtenção de Células em Alta Densidade em Cultura

A maioria dos métodos utilizados para a manutenção de alta densidade celular utiliza células imobilizadas, nas quais elas são mantidas em um volume de amostra definido e perfundidas com meio. Há vários métodos disponíveis para a obtenção de células imobilizadas. O método de imobilização a ser utilizado depende do tipo celular e das condições a serem estudadas. Alguns dos métodos mais comuns são descritos a seguir.

A retenção em gel tem sido o método de escolha para a imobilização em muitas investigações. Três dos métodos mais comuns incluem os géis de alginato, agarose e matrigel (Narayan et al., 1990; Foxall, et al. 1984; Daly et al., 1988). No caso de géis de alginato, as células são ressuspensas em uma solução concentrada de ácido algínico e, então, adicionadas a uma solução de íons divalentes. O gel forma, imediatamente, gotas esféricas uniformes. As células são encapsuladas em altas densidades. Os géis de agarose são produzidos pela ressuspensão das células em alta densidade em uma solução de agarose aquecida, forçando a solução através de um tubo fino e estreito. O fio formado é, então, empurrado do tubo para o meio. Um terceiro tipo de gel pode ser formado pelo uso de matrigel, em que é usado procedimento similar aos géis de agarose. Entretanto, nesse caso, as células podem ser semeadas a baixa densidade e proliferaram, atingindo alta densidade. Em geral, um

dos principais problemas nos métodos em que se usa retenção em gel é a difusão no interior dos fios dos géis.

Um método alternativo é o uso de diferentes microcarregadores que estão disponíveis comercialmente. Microcarregadores são *beads* macroscópicos, cuja superfície é tratada para que haja adesão celular. Microcarregadores podem ser porosos ou não. As células crescem na superfície de microcarregadores não porosos, os quais podem apresentar danos devido à perfusão. No caso de microcarregadores porosos, o crescimento celular não se limita à superfície, mas as células também podem crescer por todo o carregador, o que permite obter alta densidade. Uma desvantagem no uso de microcarregador poroso é a difusão limitada pelos poros. Para um tipo celular em particular, os estudos da curva de crescimento e de viabilidade precisam sempre ser avaliados, para se determinar o microcarregador mais apropriado. Reatores de cama fixada podem ser obtidos com matrizes disponíveis comercialmente, tais como fibracel.

A formação de esferoides ocorre quando a adesão depende do crescimento, formando um pequeno agrupamento esférico de células (Freyer et al., 1990). Quando os esferoides são pequenos, as células recebem suplemento de oxigênio e nutrientes adequados. São necessários al-

guns cuidados para que os esferoides não cresçam demais, apresentando problemas de perfusão que reduzem o crescimento. Culturas de esferoides têm sido particularmente úteis nos estudos do metabolismo de células tumorais.

Os métodos descritos anteriormente apresentam vantagens e desvantagens. Recomenda-se que para cada tipo celular leve-se em conta a questão que se pretende responder.

Descrição do Funcionamento de um Biorreator Típico

O sistema de biorreator (Fig. 36.3) consiste de um tanque fermentador com agitação, com capacidade para 2 litros de meio de cultura, cuja temperatura, pH, CO_2 e conteúdo de O_2 dissolvido são monitorizados e mantidos em uma faixa específica (Thelwall e Brindle, 1999). O meio é bombeado para o minibiorreator na máquina da RMN através de um tubo que está em um banho de água a 37°C . O minibiorreator consiste de um tubo encapsulado de polissulfona (10 mm de diâmetro) com um tubo de entrada e outro de saída. Em um experimento típico, o minibiorreator é empacotado com carregadores (Fibracel) para formar uma camada fixa. As células do carregador são, então, perfundidas

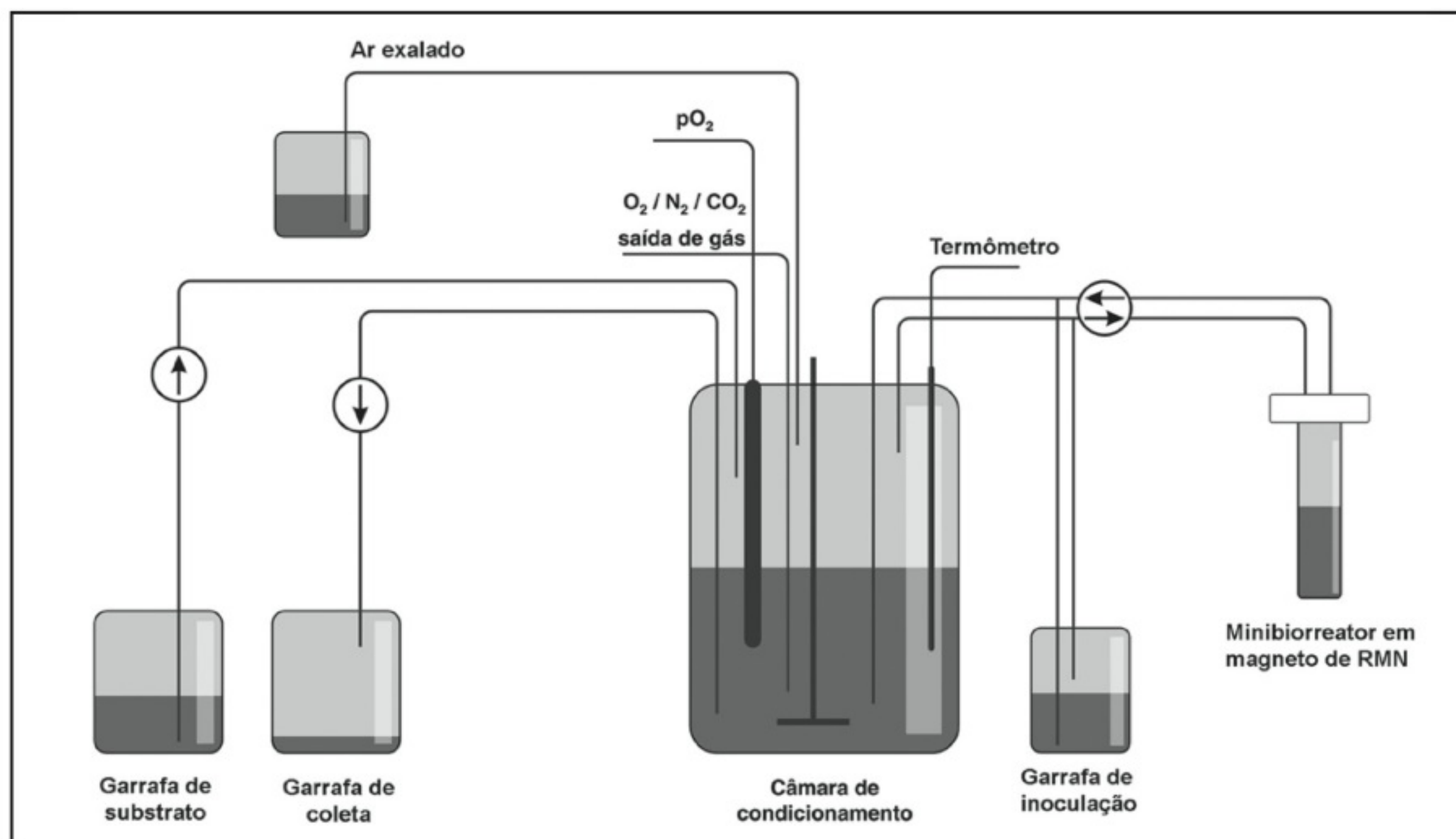


Figura 36.3 – Diagrama simplificado do *setup* do sistema biorreator.

com meio a partir do fermentador. O meio do fermentador é trocado por meio fresco usando o sistema de enchimento e esvaziamento. Pelo ajuste dos sistemas de enchimento e esvaziamento, os nutrientes podem ser mantidos em valores constantes.

Usando um aparelho ADI 1030 Biocontrolador (FT Applikon), o pH é monitorizado utilizando um eletrodo de vidro, o conteúdo de oxigênio dissolvido no meio é monitorizado por um eletrodo de oxigênio e a temperatura usando um termômetro. A temperatura é mantida a 37°C pelo uso de um banho.

As células podem ser perfundidas sob várias condições e o espectro da RMN de ^{31}P determinado. Um espectro típico da RMN de ^{31}P está mostrado na figura 36.4.

Exemplos de Estudos em Células Vivas Utilizando RMN

Há muitos exemplos na literatura nos quais a RMN foi usada para se obter respostas metabólicas em células vivas sob condições variadas. A proposta desse capítulo não é fazer uma longa revisão desses estudos, mas salientar seus pontos principais.

Uma das aplicações mais comuns é o estudo do metabolismo energético. Para conseguir a RMN de ^{31}P é usado em sistema que fornece a concentração de adenosina 5'-trifosfato (ATP) e fósforo inorgânico (Pi). Adicionalmente, pHs intra e extracelulares podem ser obtidos a

partir da troca química das ressonâncias de Pi nas células. A concentração de adenosina 5'-difosfato (ADP) livre, é geralmente, muito baixa para a detecção direta. Entretanto, foi desenvolvido um método para calcular a concentração de ADP livre a partir da observação do ATP e pH (Brindle et al., 1989). Uma área na qual a RMN de células intactas tem sido aplicada com muito sucesso é o estudo do metabolismo de células cerebrais (Alves et al., 1996; Alves, Carrondo, Santos, 1997; Alves et al., 2000; Brand et al., 1998; Flogel et al., 1994). O metabolismo de astrócitos e neurônios tem sido estudado, com muito sucesso, em várias condições, tais como hipóxia, isquemia e hipoglicemia (Alves et al., 2000). Enquanto as concentrações de ATP e fosfocreatina (PCr) em astrócitos não foram afetadas por hipóxia, em cultura de neurônio houve uma redução marcante. Por outro lado, os neurônios mostraram-se mais resistentes à isquemia.

A técnica da RMN de ^{13}C é usada para monitorizar o metabolismo de glicose em vários tipos celulares (Brand et al., 1998; Wehrle et al., 2000; Mancuso et al., 1998; Constantinidis, et al., 1997). Mancuso et al. (1998) estudaram o metabolismo de glicose e glutamina em células de hibridoma em um *hollow fibre* biorreator no qual verificaram que o fluxo de metabólitos pela via das pentoses era muito pequeno comparado ao da glicólise. A entrada de piruvato no ciclo do TCA via piruvato carboxilase não foi detectada. O sistema da RMN de ^{13}C também está sendo usado para estudar o metabolismo de astrócitos e neurônios imobilizados em gel (Alves et al., 2000; Brand et al., 1998).

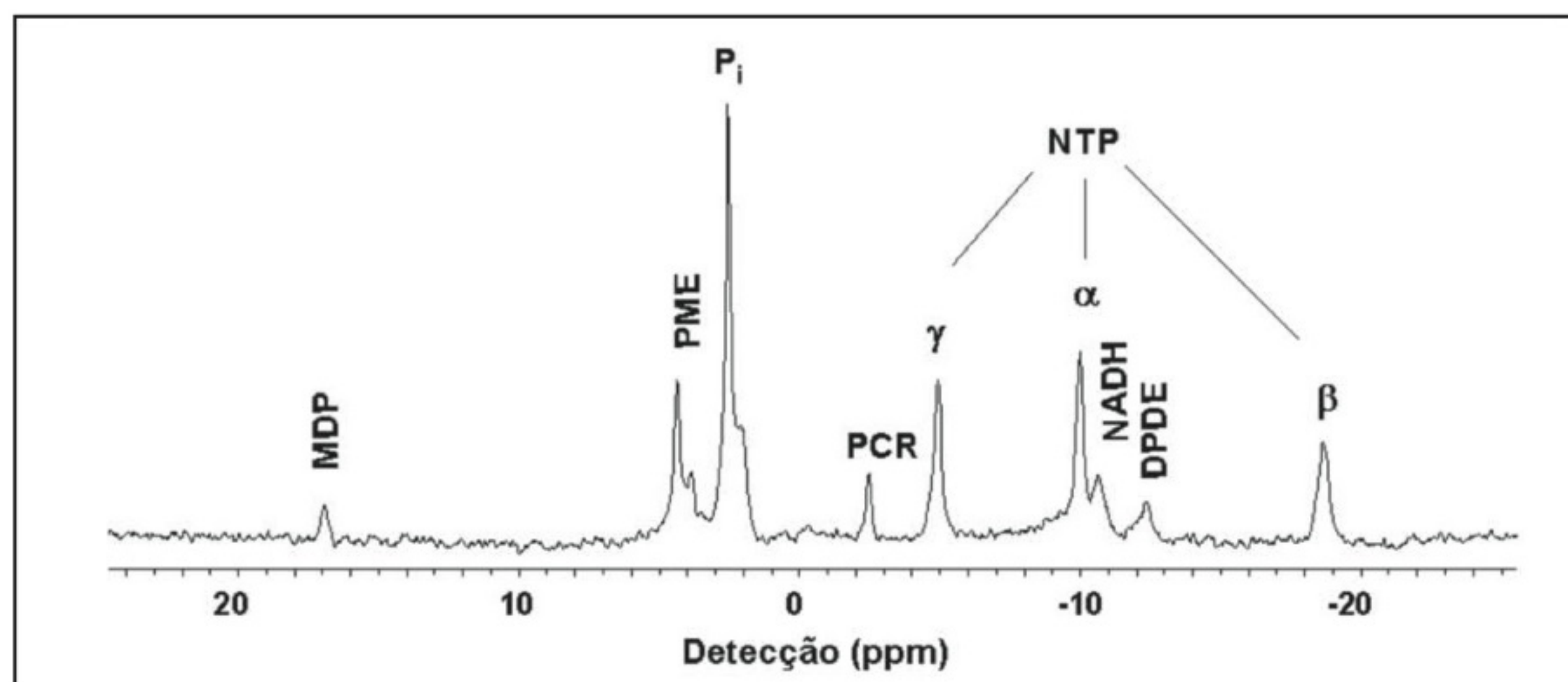


Figura 36.4 – Espectro típico de ^{31}P NMR de células intactas. NTP – Nucleotídeo trifosfato. MDP – Difosfato de metileno. PME – Fósforo monoésteres. Pi – Fósforo inorgânico. PCR – fosfocreatina. DPDE – Difosforodiesté. NADH – Nicotinamida. Ademina Dinocleotídeo.

Referências

- Alves, P.M., Flogel, U., Brand, A., Leibfritz, D., Carrondo, M. J., Santos, H., Sonnewald, U. Immobilization of primary astrocytes and neurons for online monitoring of biochemical processes by NMR, *Dev. Neurosci.*, 18:478-83, 1996.
- Alves, P. M.; Carrondo, M. J.; Santos, H. Immobilization of primary brain cells in porous microcarriers for on line NMR spectroscopy. *Animal Cell Technology*, 91-98, 1997.
- Alves, P.M., Fonseca, L.L., Peixoto, C.C., Almeida, A.C., Carrondo, M. J. & Santos, H. NMR studies on energy metabolism of immobilized primary neurons and astrocytes during hypoxia, ischemia and hypoglycemia. *NMR Biomed.* 13:438-48, 2000.
- Balci, M. *Basic. 1H and 13C NMR Spectroscopy*. Elsevier Science, 2005.
- Brand, A., Richter-Landsberg, C., Flogel, U., Willker, W., Leibfritz, D. Rat brain primary neurons immobilized in basement membrane gel threads: an improved method for on-line ^{13}C NMR spectroscopy of live cells, *Brain. Res. Brain. Res. Protoc.* 3:183-91, 1998.
- Brennan, L., Shine, A., Hewage, C., Malthouse, J.P., Brindle, K.M., McClenaghan, N., Flatt, P.R., Newsholme, P. A nuclear magnetic resonance-based demonstration of substantial oxidative L-alanine metabolism and L-alanine-enhanced glucose metabolism in a clonal pancreatic beta-cell line: metabolism of L-alanine is important to the regulation of insulin secretion, *Diabetes*, 51:1714-21, 2002.
- Brindle, K.M., Blackledge, M.J., Challiss, R.A. & Radda, G.K. ^{31}P NMR magnetization-transfer measurements of ATP turnover during steady-state isometric muscle contraction in the rat hind limb in vivo, *Biochemistry*, 28:4887-93, 1989.
- Constantinidis, I., Mukundan, N.E., Gamcsik, M.P., Sambanis, A. Towards the development of a bioartificial pancreas: a ^{13}C NMR study on the effects of alginate/poly-L-lysine/alginate entrapment on glucose metabolism by beta TC3 mouse insulinoma cells. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*, 43:721-9, 1997.
- Daly, P.F., Lyon, R.C., Straka, E.J. & Cohen, J.S. ^{31}P -NMR spectroscopy of human cancer cells proliferating in a basement membrane gel, *Faseb. J.*, 2:2596-604, 1988.
- Derome, A.E. *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*. New York, Pergamon Press, 1987.
- Fan, T.W.M. Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures., *Pro. in Nucl. Mag. Resonance Spectroscopy*, 28:161-219, 1996.
- Flogel, U., Willker, W., Leibfritz, D. Regulation of intracellular pH in neuronal and glial tumour cells, studied by multinuclear NMR spectroscopy, *NMR Biomed.*, 7:157-66, 1994.
- Foxall, D.L., Cohen, J.S., Mitchell, J.B. Continuous perfusion of mammalian cells embedded in agarose gel threads, *Exp. Cell. Res.*, 154:521-9, 1984.
- Freyer, J.P., Fink, N.H., Schor, P.L., Coulter, J.R., Neeman, M. & Sillerud, L.O. A system for viably maintaining a stirred suspension of multicellular spheroids during NMR spectroscopy. *NMR Biomed.*, 3:195-205, 1990.
- Gunther, H. *NMR Spectroscopy. Basic Principles, Concepts, and Applications in Chemistry*. John Wiley & Sons, 1995.
- Lu, D., Mulder, H., Zhao, P., Burgess, S.C., Jensen, M.V., Kamzolova, S., Newgard, C.B., Sherry, A. D. ^{13}C NMR isotopomer analysis reveals a connection between pyruvate cycling and glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 2708-13, 2002.
- Malloy, C.R., Sherry, A.D., Jeffrey, F.M. Analysis of tri-carboxylic acid cycle of the heart using ^{13}C isotope isomers. *Am. J. Physiol.*, 259:H987-95, 1990.
- Mancuso, A., Sharfstein, S. T., Fernandez, E.J., Clark, D.S., Blanch, H.W. Effect of extracellular glutamine concentration on primary and secondary metabolism of a murine hybridoma: an in vivo ^{13}C nuclear magnetic resonance study. *Biotechnol Bioeng.*, 57:172-86, 1998.
- Markley, J.L., Opella, S. J. *Biological NMR Spectroscopy*. Oxford University Press, 1997.
- Narayan, K.S., Moress, E.A., Chatham, J.C. & Barker, P. B. ^{31}P NMR of mammalian cells encapsulated in alginate gels utilizing a new phosphate-free perfusion medium. *NMR Biomed.*, 3:23-6, 1990.
- Shulman, R.G. & Rothman, D.L. ^{13}C NMR of intermediary metabolism: implications for systemic physiology, *Annu. Rev. Physiol.*, 63:15-48, 2001.
- Thelwall, P.E., Brindle, K.M. (1999) Analysis of CHO-K1 cell growth in a fixed bed bioreactor using magnetic resonance spectroscopy and imaging. *Cytotechnology*, 30:121-132, 1999.
- Waagepetersen, H.S., Sonnewald, U., Larsson, O.M., Schousboe, A. A possible role of alanine for ammonia transfer between astrocytes and glutamatergic neurons. *J. Neurochem*, 75:471-9, 2000.
- Wehrle, J.P., Ng, C.E., McGovern, K.A., Aiken, N.R., Shungu, D.C., Chance, E.M. & Glickson, J.D. Metabolism of alternative substrates and the bioenergetic status of EMT6 tumor cell spheroids. *NMR Biomed.*, 13:349-60, 2000.
- Zwingmann, C., Richter-Landsberg, C., Brand, A., Leibfritz, D. NMR spectroscopic study on the metabolic fate of [3-(^{13}C)]alanine in astrocytes, neurons, and cocultures: implications for glia-neuron interactions in neurotransmitter metabolism. *Glia*, 32:286-303, 2000.

Índice Remissivo

- 2-mercaptoetanol, 51
- 4-metilumbeliferil fosfato, 238
- Metilumbeliferil galactosídeo 6-sulfato, 238
- 4-metilumbeliferil- β -D-galactopiranosídeo, 238
- 4'-aminometil-4,5-dimetil-isopsoralen (4'AMDMIIP), 126
- Absorbância ou Absorvância, 61, 219
- Absortividade
 - molar, 35; 238
- Acetilação, 365
- Acetato de celulose, 49; 50
- Acetonitrila, 311; 313
- Ácido(s)
 - ascórbico, 233
 - clorídrico, 125
 - desoxirribonucleico, 2; 9; 10
 - fosfórico- H_3PO_4 (P A), 228; 229; 230
 - nucleico(s), 9; 10; 19; 20; 21; 47; 48; 49; 50; 52; 53; 95; 96; 98; 100; 104; 107; 109; 111; 181; 182; 183; 184; 185; 263; 267; 268; 269
 - aplicações, 39
 - extração de, 39; 41
 - kits*, 46
 - nucleotídeos, 47; 48; 52; 54
 - precipitação de, 45
 - reagentes, 29; 30; 32; 35; 39; 43; 46
- retinoico, 399
- ribonucleico, 2; 9; 12
- siálico, 354
- tricloroacético, 375; 376
- Acrilamida, 49; 53; 54; 55; 56
- Adenosina, 26; 27
 - trifosfato, 4; 59
- Adsorção passiva, 235
- Afinidade avidina/biotina, 238
- Agente(s)
 - DTT, 262; 266; 267; 269; 270; 271; 273; 274
 - estabilizantes
 - DMSO (dimetilsulfóxido), 212; 213; 214
 - glicerol, 212; 214
 - iodoacetamida, 274
 - metiltiolante, 366
 - reduzidor(es), 263; 269; 270; 273; 274; 365; 366; 369
 - DTT (ditiotretitol), 208; 212; 214
 - mercaptoetanol, 208; 214
- Agrupamento hierárquico, 77; 79
- Albumina de soro bovina-fração V (BSA, 231
- Alças (*looping*), 23
- Álcool
 - etílico, 125
 - Isoamílico, 43; 44
- Aminoácido(s), 2; 3; 5; 6; 207; 208; 209; 210; 212; 214
 - ácido, 366; 369; 370; 371
 - aromáticos, 191
 - básico, 366
 - carregados negativamente, 191
 - carregados positivamente, 191
 - composição química, 320; 321
 - cromóforo, 339; 341
 - do tipo dextrógiro, 339
 - do tipo levógiro, 339
 - fluoróforo, 339; 341; 344
 - hidrofóbicos, 201; 203; 204
 - massa molar, 310; 311; 314; 315; 316; 317; 319; 320; 321; 322; 323
 - não polares, 191
 - polares, 191
 - reação de derivatização ou acoplamento, 341
- Amostra(s)
 - coleta, 77; 80
 - de leite, 225; 230
 - estocagem, 75
 - preparação, 245
 - variabilidade aleatória das, 80
- Amplificação, 123; 124; 125; 126; 127; 135; 138; 139; 142; 144; 155; 300; 330
 - cinética da reação, 96; 102
 - cossolventes, 102
 - efeito platô, 98
- Amplitude, 283
- Análise
 - de células ou partículas
 - de complexidade interna, 281; 282; 284
 - de granulidade, 281; 292
 - de partículas em fluxo, 281
 - de tamanho, 281
 - intensidade de fluorescência, 281; 283; 292
 - de dados
 - gráfico *dot plot*, 284
 - histograma, 283; 287

- de múltiplos RNAs, 88
- enzimática, 403; 404; 405; 406; 409; 410; 412; 413
- glicoproteínas
 - HPLC, 356
 - Kits* para, Proteínas glicosiladas, 351; 353
 - transfecção de células, 356; 357
- Anfólitos, 261; 262; 263; 270; 271
- Anti
 - nitrosocisteína, 366; 367
 - biotina, 366; 369
- Anticorpo(s), 249; 250; 251; 252; 258; 259; 293; 294; 295; 296; 297; 298; 299 300; 301; 304; 305; 360; 362
 - imunoglobulina, 284
 - imunofenotipagem, 284; 285
 - incubação, 244; 246
 - ligações cruzadas ou inespecíficas, 360
 - marcadores de superfície, 284; 292
 - monoclonais, 284; 287; 290; 291
- Anticódon, 14; 15; 27
- Antígeno(s), 243; 244; 246; 284; 292; 293; 294; 295; 296; 297; 298; 299; 300; 301; 302; 305; 306
- Aplicações da metodologia, 226; 228; 230; 233
- Ataque nucleofílico, 210; 211
- Ativação
 - policlonal de leucócitos, 287
- Atividade
 - enzimática, 403; 404; 405; 406; 409; 412; 413
 - exonuclease, 100; 105
 - RNAse H
 - MMLV, 105
 - AMV 105; 106
- ATP, 4; 5; 7
- Autorradiografia, 276; 375; 376; 378; 385; 388
- Background*, 78
- Bactéria, 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7
- Bancos de Dados
 - EMBL, 100
 - GDB, 100
 - GenBank, 99; 100
 - GSDB 100
- Base(s) nitrogenada(s), 9; 10; 11; 12; 13; 195
- BCA-ácido bicinchonínico (4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolína), 233
- Beta-galactosidase, 238
- Bicamada lipídica, 39
- Bioinformática, 73; 77
 - análise da espectrometria, 312
 - digestão "*in silico*", 319
- Biomarcadores, 80; 81
- Biopolímeros, 192; 194
- Biotina, 29; 34; 36; 37; 64; 159; 183; 184
 - biotin switch*, 366; 367; 369
 - avidina, 36
 - estreptavidina, 36; 37
- BiP, 203; 204
- Bloqueio, 238; 239; 240; 241
- Blotting*
 - immunoblotting*, 235
- Brometo
 - de Cianógeno, 378
 - de etídio, 31; 45; 103
- Bromofenol, 270; 271; 274
- Cadeias Polinucleotídicas, 10
- Campo Elétrico, 47; 48; 50; 55
- Câncer, 76; 81
- Cap G, 14; 23
- Carboidrato, 3; 6; 331; 351; 353; 354; 355; 356; 358
- Carbonato de sódio, 231
- Carboxipeptidase, 377
- Cargas elétricas, 47
 - migração, 47; 48; 49; 50; 51; 52; 53; 54; 55
 - pH, nas, 50
- Caseína, 225; 228; 229; 230; 238
- Catalisador, 191; 194; 195
 - de Cu (II), 230
- Cauda de poli-A, 25
- cDNA, 73; 74; 76; 77; 84; 87; 131; 132; 133; 136; 137; 138; 139; 140; 142; 152; 153; 155; 171; 172; 175; 183
- Célula(s), 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 191; 192; 194; 195; 293; 294; 295; 302; 304; 305
 - Eucariótica(s), 2; 3; 4; 5; 7; 12; 22; 23; 39; 203; 398
 - Procariótica(s), 2; 3
- Centros metálicos, 365
- Chaperonas
 - chaperoninas, 203
 - HSP60, 203
 - HSP70, 203
- Ciclo(s)
 - celular, 285; 287
 - BrdU na análise de fase S, 163
 - fase S, 160; 163; 164
 - número de, 95; 98; 102; 104
- Cílio, 5
- Cis-trans-prolil isomerases, 203
- Cisteína(s), 365; 366
- Citoesqueleto, 4; 8
- Citômetro de fluxo, 281; 282; 283; 285; 291
- Citoplasma, 2; 3; 4; 5; 6
- Citosina, 10; 11; 12; 19
- CLAD, 325; 326

- Clonagem gênica, 123
 Clone(s), 131; 135; 151
 Clorofórmio, 43
 Cloroplasto(s), 4; 5
 Códon(s), 14; 15; 17; 26; 27
 Coloração
 com prata, 268; 272; 274; 276
 com coomassie, 272; 276; 277
 negativa zinco-imidazol, 276
 Colorimétrico, 29; 30; 34; 35; 36
 Coluna(s), 325; 326; 327; 328; 329; 332; 335; 336; 337; 339; 340; 342; 344; 345
 Conformação tridimensional, 50
 Complementariedade, 11; 12; 17; 21; 23
 Complexo(s)
 antígeno-anticorpo, 293; 294; 296
 de Golgi, 3; 6; 8
 DNA-proteína, 400
 Compostos fenólicos, 269
 Con A-Sepharose, 354; 355
 Concentração protéica
 Bradford, 246
 Conjugados, 293; 297; 298; 300
 Constante(s)
 de equilíbrio e associação (K), 243
 dielétrica
 acetona, 207; 212
 metanol, 213
 termodinâmica, 243
 Construção, 167; 169; 171; 173; 174; 176; 177
 Contaminação da amostra
 corantes, 312; 313
 detergentes, 313
 queratina, 311; 312
 saís, 313; 315
 Controle(s), 167; 173; 177; 238; 239; 240; 241; 300; 301; 305
 isotípico(s), 287; 292
 Corante(s)
 azul de bromofenol, 252; 254; 255
 brometo de etídio, 49
 comassie brilliant blue, 49; 227; 228; 229; 230
 G-250, 227; 228; 229; 230
 prata, 49
 SybrTM Green, 49
 vermelho de ponceau, 49; 252; 257; 258
 CPRG, 238
 Cromatografia, 327; 329; 331; 332; 333; 335; 336; 337; 339; 340; 341; 348; 349
 2D, 375; 381; 383; 386
 biogel, 208
 de afinidade, 208; 353; 354; 355
 de camada delgada, 375; 379; 382; 384
 de filtração em Gel, 208
 de troca Iônica, 208
 líquida de alto desempenho (HPLC-*high performance liquid chromatography*), 325; 326
 líquida multidimensional, 310; 323
 automatizada, 339
 coluna de fase reversa, 342; 344
 colunas de troca iônica, 328; 336; 340
 com gradiente, 339
 cromatograma, 336; 341
 desvantagens, 330; 339; 341
 detector de ultravioleta, 339
 em camada delgada, 339
 em placa de poliamida, 340
 sensibilidade do método, 339; 344
 sistema de gradiente, 325; 335; 342; 345
 sistema isocrático simples, 342
 vantagem do método, 339; 340
 sephadex, 208
 sepharose, 208
 Crossmatching (transplantes), 285
 Cultivo celular
 carenciamento, 159; 160
 estímulo para bloqueio da expressão protéica, 160; 162
 fixação culturas, 160; 163
 imunocitoquímica, 160; 161; 163; 165
 incubação do complexo *sense/antisense*, 160
 plaqueamento, 159; 162; 164
 Curva
 de dissociação, 115
 padrão, 109; 118; 120; 227; 229; 232
 CY5-estreptavidina, 76
 D-aminoácido, 191
 D-aspartato, 191
 Densidade óptica, 64
 Deoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), 98; 101
 DEPC, 84
 dietilpirocarbonato, 60; 66; 67
 Derivatização, 366
 Descoloração
 comassie brilliant blue (CBB), 312
 fluorescência, 312
 prata, 312
 Desnaturação, 123; 124
 de proteínas, 41
 Desnaturante(s), 59; 61; 62; 63; 68
 Desvios
 instrumentais, 220
 químicos, 220

- Desoxirribose(s), 195
 Desoxirribonucleotídeo(s), 31
 Detecção
 de proteínas, 235
 de glicoproteínas, 351; 352; 354; 355
 substrato cromogênico, 237; 240; 241
 Detectores
 de fluorescência, 330; 344
 de índice de refração, 331
 de luz
 frontal, 282
 lateral, 282
 eletroquímico, 330; 331
 espectrofotométrico, 330
 Detergentes
 sulfato de sódio dodecila, 39; 40
 iônicos, 268; 270
 sulfato de sódio Laurico, 40
 saponina, 39; 40
 triton X-100, 39; 40; 42
 Determinação Quantitativa
 absorbância (OD), 88
 curva padrão, 88
 rendimento da reação, 88
 Diálise, 208; 214
 Digestão enzimática
 alquilação 313
 desidratação do Gel 313
 digestão 311
 reagentes 312
 redução 313
 reidratação do Gel 313
 Digoxigenina 183; 184; 187; 188
 Diluição seriada em duas dimensões 237; 238
 Dimetilsulfoxido e duodecilsulfato de sódio, 127
 Distribuição de Boltzmann, 415
 anaplerótica, 418
 beads, 419
 encapsulado de polissulfona, 420
 hollow fibre, 421
 isotopômero, 417; 418
 matrigel, 419
 microcarregadores, 419
 minibiorreator, 420
 sistemas de biorreator, 419
 DNA, 2; 3; 4; 6; 8; 39; 41; 43; 44; 45; 389; 390; 391; 392;
 393; 394; 396; 397; 398; 399; 400
 complementar, 84
 desnaturação, 102
 DNA molde, 96; 98; 102
 DNase, 76; 104; 106
 extensão, 95; 96; 98; 100; 101; 102; 103
 extremidade, 3' 14; 15; 19; 22; 25
 extremidade, 5' 14; 17; 23; 25
 fita dupla, 21
 glicosilases, 126
 hibridação, 96
 polimerase, 20; 21
 eficiência, 100
 Taq DNA polimerase, 96; 101; 102
 taxa de síntese, 98; 100; 101
 dNTP, 31; 32
 Dobramento, 200; 201; 203
 Dogma central, 195
 DTT, 87; 89
 ditiotritol, 51
 EDTA, 42; 46; 224; 233
 Eficiência de amplificação, 117; 118; 119
 Eletroendosmose, 51; 52
 Eletroforese, 60; 61; 62; 65; 67; 138; 139; 141; 142; 145;
 146; 147; 149; 207; 208; 212; 214; 223; 249; 251;
 252; 253; 255; 256; 375; 376; 378; 379; 380; 381;
 382; 383; 384; 385; 387; 388
 associada a fluorometria, 360
 bidimensional, 49; 261; 262; 271; 274
 focalização isoeletrica, 310; 313
 SDS-PAGE, 310; 313
 capilar, 52
 contraimuno-eletroforese, 48; 52
 em gel 2D, 360
 em gel de agarose, 103; 104
 em gel de poliacrilamida, 103; 261; 273
 em zona, 49; 50
 separação por, 265; 360; 378
 Eletromagnética, 218
 ELISA, 399; 400
 de captura, 236; 237; 239; 241
 de competição, 237
 direto, 237
 indireto, 237
 problemas, 241
 sandwich, 237; 241
 soluções e reagentes, 240
 EMSA, 389; 390; 391; 393; 394; 395; 396; 398; 399;
 400
 Endoproteinase
 Asp-N, 377
 específica de prolina (proline specific), 377
 Glu-C, 377
 Enhancers, 23

- Enzima(s), 29; 30; 32; 33; 34; 35; 36; 37; 181; 182; 183; 184; 185; 186; 187; 237; 238; 239; 240; 241; 403; 404; 405; 406; 407; 408
 antioxidante, 406; 407; 408
 de restrição, 50; 52; 53; 132; 133; 135; 139; 152; 155
 lisozima, 39; 41; 42
 proteinase, K 39; 41; 42
 proteolíticas
 carboxipeptidases, 211
 metalo-proteases da matriz extracelular (MMPs), 209; 211; 212; 213
 proteases dependentes de ATP, 211
 proteases lisossômicas, 210
 proteólise ilimitada, 209
 proteólise limitada, 209
 susceptibilidade, 211; 212
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 236
 Epítomos, 294; 295; 299; 300; 301; 302
 Especificidade(s), 293; 294; 301
 Espectroscopia de ressonância magnética, 415
 Espectrofotometria, 61; 217; 220; 223
 Espectrofotômetro, 237; 239; 240; 325; 326; 340; 344
 Espectrometria
 de absorvância, 366; 367
 de massa, 309; 310; 311; 359; 360; 366
 Electrospray, 313; 314; 315
 ESI, 323
 ESI/MS/MS, 314
 espectrômetros, 315
 fragmentação de Íons, 323
 MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), 312; 313; 314; 315; 316; 319
 MALDI ToF *reflectron*, 319
 MALDI-PSD, 314
 MS/MS, 314; 321; 322; 323
 Peptide Mass Fingerprint, 313; 314; 319; 320
 Princípios, 314
 PSD, 314; 321; 323
 Resolução, 315; 317; 318; 318; 319; 321
 Estabilidade, 220; 221
 Estatística
 Anova, 79
 curva Lowess, 78
 Mann-Whitney, 79
 normalização por quantil, 79
 testes t, 79
 Estringência, 64; 65
 Estrutura(s), 199; 200; 201; 202; 203
 coacervadas, 192
 primária, 199; 200; 202
 quaternária, 199; 201; 202
 secundária(s), 199; 200; 201; 202; 377
 “alças”, 99
 terciária, 199; 200; 201; 202
 Etanol, 35; 45; 228; 229; 231
 Etiquetas (*tags*), 131; 132; 133; 135; 140; 141; 142; 143; 144; 152; 153; 155
 Evento(s)
 número de, 283; 284; 287
 gradiente de densidade, 288; 290
 Êxons, 14; 21; 23; 25; 27
 Expressão
 gênica, 64; 73; 75; 76; 77; 79; 80; 81; 83; 97; 131; 152; 157; 160; 167; 177; 398
 de proteínas, 160; 162
 Extração
 bactérias gram negativas, 40; 41; 42; 43
 bactérias gram positivas, 41
 enzimática(s), 403; 404; 405; 406; 409; 410; 412; 413
 fungos, 39; 41
 leveduras, 41
 tecidos, 39; 40; 41
 FACS, 75
 Faixa de linearidade e estabilidade, 226; 228; 230
 Farmacogenômica, 81
 Fase(s)
 estacionária, 325; 328; 329; 336; 382
 exponencial, 109; 110; 117
 linear, 109; 110; 118
 móvel, 326; 328; 329; 336; 345; 348
 reversa, 328; 329; 339; 342; 344; 347; 349
 Fator(es)
 de capacidade, 328
 de iniciação, 16; 17
 de regulação experimental
 captação e distribuição do ODN na célula, 164
 efeitos cinéticos, 165
 efeitos dos ODNs controle, 165
 estrutura RNA, 164
 ligação em alvos não-nucleotídicos, 165
 pureza dos ODNs Oligonucleotídeos, 164
 de separação, 328
 de transcrição, 14; 16; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 27; 390; 391; 398; 399; 400
 Fenol, 39; 41; 43
 Fenolftaleína, 231; 232
 Fenótipo, 284
 Filme de raio X, 250; 251; 252

- Filtro(s)
 de passagem curta, 282
 de passagem de banda, 282
 de passagem longa, 282; 283
- Fixação, 62; 69; 182; 185; 187
- Fixadores, 295; 298; 300; 301; 302
- Flagelo(s), 4; 5
- Fluorescência, 31; 35; 250; 281; 282; 283; 284; 291; 292; 330; 331; 339; 341; 342; 344
 Fluoresceína di- β -galactosidase, 238
- Fluorescente, 109; 110; 111; 112; 113; 114; 115; 116; 117; 118; 119; 120
- Fluorimetria, 404
- Fluorímetro, 344; 372
- Fluorocromo, 282; 284; 287; 288; 289; 290; 291; 292
- Fluorometria, 359; 360
- Focalização isoeletrica, 261; 270; 273
- Foco hidrodinâmico, 281
- Folding*, 200; 205
- Formamida, 183; 184; 186; 189
- Fosfatase alcalina, 30; 31; 34; 35; 36; 238
- Fosfatidilinositol 3-quinase, 361
- Fosfoaminoácidos, 359; 360; 361; 375; 380; 384; 385; 386; 387
- Fosforoimagem*, 33
- Fosfolipase C, 354
- Fosfopeptídeos, 375; 379; 380; 381; 384; 385; 388
- Fosforilação, 360; 360; 361; 365
 defosforilação, 384
 N-fosforilação, 359
 O-fosforilação, 359
 S-fosforilação, 359
- Fosfotirosina, 377; 384; 385; 386
- Fotoelétrons, 33
- Fotometria, 404
- Fotomultiplicador, 281; 282
- Fotossíntese, 4; 5; 6; 7
- Ftalato ácido de potássio, 231; 232
- FWHM (Full Width at Half Maximum)*, 318
- Gel
 bisacrilamida, 249; 253
 de agarose, 49; 51; 52; 53
 alcalino, 53
 desnaturante, 51; 53; 54
 não restritivo, 52
 restritivo, 52
 de poliacrilamida, 48; 49; 50; 51; 53; 54; 55; 56; 249; 251; 253; 255
 nativo, 53; 54
 desnaturante, 53; 55
 de empilhamento, 55; 56; 253; 255
 poliacrilamida, 48; 49; 50; 51; 53; 54; 55; 56
 polimerização, 253; 255
 separação, 47; 49; 50; 51; 52; 53; 54; 55; 56
- Gene(s), 2; 3; 6; 7; 8; 14; 21; 22; 23; 27; 167; 168; 169; 171; 172; 173; 175; 176; 177
- Housekeeping*, 78; 83
- Ciclofilina, 87
- GAPDH, 87
- β -actina, 87
- Gene repórter, 111; 112; 114; 115; 116
- Genoma(s), 131; 132; 133; 153
- Glicina, 55; 56
- Glicose-6-fosfato desidrogenase, 238
- Glicosidases, 351; 353; 354; 356
- Glicosilfosfatidilinositol, 350
- Glicofosfolipídeos, 353; 354
- Glicoproteína
 de membrana glicosilação, 351; 353; 354
 de organela, 353
 não secretada, 353
 secretada, 353
- Glutaraldeído, 312
- Glutathione
 Peroxidase, 406; 407; 408; 410; 412
 Redutase, 406; 407; 408; 411; 412; 413
- Gradiente binário, 327; 336
- Grupamento fosfato, 195
- Grupo tiol, 365
- Guanina, 10; 11; 12; 19
- Hairpins*, 12
- Heteroduplex*, 64; 65
- Helicase, 17; 21
- Hibridação, 29; 30; 32; 33; 59; 62; 63; 64; 65; 70; 71; 123; 157
 genômica comparativa, 182
 fluorescência, 76
in situ, 87; 181; 182; 183; 185; 186
in situ de cromossomos, 182
in situ fluorescente, (FISH) 182
 Pré-hibridação, 63; 70; 71
 quimioluminescência, 76
 Sinal de hibridação, 59; 64; 65
- Hidrofobicidade, 382
- Hidrogênio
 pontes de, 183; 184
- Hidrolases, 208; 210
- Hidrólise
 ácida, 384
 RNA, 44

- Hidróxido
de sódio, 39; 45; 225; 226; 228; 229; 231; 232
- Hipoclorito, 125
- Hipótese de Oparin-Haldane, 192
- Homogeneização, 265
- Homogeneizado de tecido, 224; 229; 232
- HOPPA, 238
- HPLC, 325; 326; 327; 328; 329; 331; 332; 333; 334; 335; 336; 337; 339; 340; 341; 342; 344; 345; 347; 348; 349
- Identificação de peptídeos e proteínas, 227
- Immunoblotting*, 244; 247
- Imunocoloidal, 297
- Imunoensaio enzimático, 235; 236; 296; 297; 298; 299; 300; 303
- Imunofluorescência, 297; 304
- Imunoistoquímica, 293; 294; **295**; 296; 297; 298; 299; 300; 301; 302; 305; 306
- imunocitoquímica, 366
- Imunoperoxidase, 159; 161; 163; 164
- Imunoprecipitação, 252; 359; 360; 366; 370
- identificação de proteínas, 325; 243; 246
- imunoprecipitado, 243; 246
- Inativação gênica, 167; 168; 169; 170; 171; 172; 177
- Incubação, 237; 238; 239; 240; 241
- Inibidores, 369; 370
- de fosfatases, 243; 245
- de proteases, 212; 213; 214; 246
- de transporte e secreção
- Monensina, 287
- Brefeldina A, 287; 291
- quenchers*, 115
- Injetor, 325; 326; 327; 328; 332; 335; 337; 342
- Insulina, 361; 362
- autofosforilação do receptor, 361
- receptores, 361
- Interferentes, 221; 225; 226; 228; 230; 232; 233
- Íntrons, 14; 18; 21; 23; 25; 27
- Iodeto
- de potássio, 225; 226; 227
- de sódio, 39; 45
- IRS-1, 361
- Isômeros, 191; 195
- Íons
- caotrópicos, 76
- magnésio, 101
- Isopropanol, 45
- Isotiocianato de guanidina, 41
- Isótopos radiativos, 29
- Laser
- de helioneônio, 284
- de íon argônio, 284
- Lectinas, 353; 354; 355
- Lei de Beer-Lambert, 219; 220; 221; 226; 230
- Ligações
- fosfodiéster, 12; 47
- glicosídicas, 9; 41; 351; 352
- químicas, 235
- Lipídeo(s), 2; 3; 4; 6; 7; 263; 267; 269
- Lipossomos, 159; 160; 161; 165
- Lise, 263; 264; 265
- celular, 39; 40; 42; 43; 46
- enzimática, 264
- fração subcelular, 263
- mecânica, 40
- congelamento e descongelamento, 40
- homogeneização, 41
- sonificação, 40
- osmótica, 42; 264
- por congelamento, 264
- por detergente, 264
- por ruptura celular, 263; **264**; **265**
- Lisossomo, 4; 8
- Luminol, 238
- Luz
- comprimento de onda, 282; 289; 291
- difratada, 282
- em fase, 281
- emitida, 282
- fótons, 282
- monocromática, 281
- refratada, 282
- unidirecional, 281
- Macroarray*, 73; 76; 78
- Marcação radioativa, 88
- Marcador(es)
- fluorescentes, 110; 111; 112; 113; 114; 115; 116; 117; 119
- isotópico, 30; 31; 32; 33; 34
- não isotópico, 30; 33; 34
- Massas monoisotópicas, 323
- Matriz(es), 328; 335
- 2,4,6-tri-hidroxi-acetofenona, 315
- ácido α -ciano-hidroxicinâmico, 315; 316
- ácido sinapínico, 315
- Meiose, 6; 7
- Membrana(s)
- de nitrocelulose, 62; 249; 250; 255
- de náilon, 59; 62; 63; 63; 66; 69; 73; 76

- nuclear, 3
- plasmática, 2; 3; 4; 5; 6; 7
- Mercaptoetanol, 368
- Metabolismo, 1; 4; 5; 7; 415; 416; 417; 418; 419; 421
 - de células, 415; 416; 419; 421
- Metabólitos, 415, 416, 417, 418, 421
- Metais de transição, 365
- Metanol, 311
- Método(s), 167; 170; 171; 172; 173; 174; 177
 - absorção em ultravioleta, 232
 - de Biureto, 225; 226
 - de Bradford, 227; 228
 - de Lowry, 230; 233
 - de Smith ou BCA, 233
 - Palkovits, 224
 - p-cloranil, 232
- Microarranjos, 131; 132
- Microarray, 73; 74; 75; 76; 77; 79; 81
 - aplicações, 80
 - desenho experimental de, 75, 78, 80
 - normalização do, 78
 - softwares 74, 76, 78
 - validação, 80
- Microscopia 293; 296; 297; 298; 304
- Micro-SAGE, 135
- Miller, 192
 - experimento de, 193
- Mitocôndria, 4; 5; 7; 8
- Mitose, 6; 7
- Mobilidade eletroforética, 389
- Modificações pós-traducionais, 365
- Molécula(s), 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7
 - alvo, 109; 110; 111; 112; 114; 117; 118; 120
 - Sinalizadora, 29; 31; 33; 34; 36; 37
- Morte celular e apoptose, 287
- Multicelular, 1; 6

- NADP glicose-6-fosfato, 238
- Neurotoxicidade, 55
- NCBI, 152; 153; 155
- Nitração, 365
- Nitrato de prata, 45
- Nitrocelulose, 378; 384; 388
- Nitrosilação
 - denitrosilação, 365
- Nitrosotióis, 365; 366; 367
- Níveis
 - eletrônicos, 219
 - energéticos, 219
 - rotacionais, 219
 - vibracionais, 219

- Nla III, 132; 133; 137; 138; 139; 140; 142; 146; 147; 153; 155
- Normalização, 111; 117; 118; 119
- Northern Blotting*, 59; 61; 62; 64; 65; 68; 70; 72; 87; 88; 182
- NTP, 31; 32; 85; 420
- Nuclease(s), 126
 - DNase, 42
 - inibidor(es), 39; 41
 - RNase, 39; 42; 43
- Núcleo(s), 2; 3; 6; 7
- Nucleotídeo(s), 9; 10; 11; 12; 14; 15; 17; 18; 21; 22; 23; 24; 27; 95; 96; 98; 99; 100; 101; 105; 106; 168; 169; 170; 171; 175
 - biotinilados, 76
 - CY3, com, 76; 77
 - limitante(s), 84; 85; 86; 87
 - não incorporados, 85; 86; 89; 90
 - não marcados, 85; 87; 88
 - UTP (Uridina tri-fosfato), 84; 85; 86; 89; 93
- Nutriente(s), 1; 2; 4; 5

- ODN(s), 157; 160; 161; 162; 163; 164; 165
- Oligo/(dT), 132; 133; 136
- Oligonucleotídeos
 - fosforotioatos, 157; 158; 158; 164; 165
- Oligonucleotídeos, 167; 171; 172; 173; 175; 176
 - sintéticos, 74
- Oligossacarídeos, 351; 353; 356
 - N-ligados, 204; 205
 - O-ligados, 204
- ONPG, 238
- OPD, 239
- Organela(s), 2; 3; 4; 5; 7; 8; 353
- Organismos ternófilos 123
- Ortofosfato radiativo, 375
- Oxidação
 - ácido perfórmico, 376; 377; 378
- Óxido nítrico, 365

- Padrão competitivo, 109
- Panspermia, 196; 197
- Paracetamol, 233
- Parede celular, 2; 3; 4
- PCA (análise de componente principal), 77; 79
- PCR, 42; 45; 73; 74; 80; 132; 133; 137; 138; 139; 141; 142; 144; 145; 146; 151; 152; 153; 155
 - em tempo Real, 109; 110; 111; 115; 116; 118; 119; 120
 - RT-PCR, 109; 110; 116; 118
- PDI (proteína dissulfeto isomerase), 201; 204

- Peagômetro, 239
- Penicilinas, 233
- Peptidases de sinal específicas, 204
- Peptídeo(s), 191; 192; 193; 194; 196; 261; 266; 277
 de digestão do gel, 311
 eluição, 311
 extração automatizada, 311
 extração manual, 311
 procedimentos, 311; 313
 ligações peptídicas, 379; 384
 sequenciamento, 310; 314; 321; 323
- Permeabilização, 182; 185
- Peroxidase, 30; 34; 35; 36; 37; 238; 239; 241
- Peso molecular, 47; 49; 50; 51; 54; 55; 249; 250; 252; 253
- PHPA, 238
- Pirimidinas, 10; 12
- Plasma sanguíneo, 224; 226; 227; 228; 229; 230; 233
- Plasmídeo(s), 50; 51; 84; 85; 88; 167; 168; 171; 172; 173; 174; 175; 176; 177
 eletroforese de, 51; 61
- Platô, 109; 110; 112
- Ploidia, 285
- pNPP, 30; 238
- Poliacrilamida, 261; 271; 273; 376; 378; 379
- Poliestireno não irradiado, 235
- Polimerases
 precipitação acetato de sódio, 85; 86
 precipitação cloreto de lítio, 85; 86
 precipitação etanol, 85; 86
 purificação gel, 85; 86
 Sephadex, 85; 86; 89; 90
 SP6, 84; 85; 87; 89; 93
 T3, 84; 87
- Polimorfismo, 123
- Poli-peptídeo(s), 328
- Polissacarídeos, 269
- Ponto isoeletrico, 48; 207; 261; 270; 271
- Primers, 19; 20; 21
 oligonucleotídeos
 características necessárias, 96; 98
 com caudas, 100
 degenerados, 100
 dímeros, 98; 99; 103
 hibridação, 95, 95, 99, 100, 102, 103
 oligo-específicos, 100; 106
- RT-PCR
 oligo (dT), 106
 oligoespecífico *antisense*, 106
 oligonucleotídeos randômicos, 106
- Primer-dimer, 98
- Produtos de PCR
amplicons, 95; 104
 análise, 104
 fita simples, 104
 inespecíficos, 96; 98; 99; 100; 101; 102; 103
- Promotor, T7 76
- Protease(s)
 aspartato-proteases, 209; 210; 212; 213
 cisteíno-proteases, 210; 211; 213
 inibição, 263; **266**
 metaloproteases, 209; 211; 212; 213
 proteção, 263
 serino-proteases, 210; 213
- Proteica(s)
 com acetato de amônio e metanol, 267
 com acetona, 264; 267; 268; 269; 270
 com sulfato de amônia, 267
 com TCA, 267
 com TCA em acetona, 267; 268
- Proteína(s), 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 14; 15; 16; 17; 18; 21; 22; 23; 25; 26; 27; 157; 158; 159; 160; 161; 162; 163; 164; 165; 375; 376; 377; 378; 379; 380; 384; 385; 388
 aminoácidos, 48; 359; 360; 361
 aminoácidos, carga dos 48
 análise
 por cromatografia, 359
 por espectrometria de massa, 359; 360
 por fluorimetria, 359; 360
 por imunofluorescência, 359
 por imunistoquímica, 360
 por imunoprecipitação, 359; 360
 por radiomarcagem com ³²P (fosfato radiomarcado), 360
 por *Western Blotting* (*immunoblotting*), 362
- A-sepharose, 246; **246**
 carga iônica, 207; 208
 catalisadoras (enzimas), 191
 células aderidas em substrato, 245
 células em suspensão, 245
 concentração, 249; 253; 258
 contráteis ou de motilidade, 191
 de defesa, 191
 desnaturação, 51; 249; 253; 262; 274
 digestão, 277
 dissulfeto isomerases, 203
 domínios, 200; 201; 202
 em tecido nervoso (*micropunch*), 229
 especificidade de ligação, 207; 208
 estabilidade, 34; 41; 42; 43
 estruturais, 191

- extração, 244; 245; 252
- fosfatase(s), 360; 362
 - fosfo-serinas/fosfotreoninas fosfatases, 359
 - fosfotirosinas fosfatases (PTP), 359
- Glicosiladas, 351; 353; 354; 355
- hidrólise, 361; 384; 385; 403
 - ácida e/ou enzimática, 360; 384
 - fluoróforo, 360
 - grupos fosfatos, 360
 - parcial alcalina, 360
- identificação, 214; 215; 309; 310; 311; 314; 320; 321; 323
- intracelulares
 - citocinas, 287; 290; 291
- ligadora de DNA, 389; 390; 398
- macroglobular, 341
- manipulação, 212
- nutrientes e de armazenamento, 191
- precipitação, 39; 44; 45; 263; 264; 267; 268; 269; 337; 341; 357; 359; 376; 384
- precipitação do anticorpo, 246
- proteína G, 246; 354; 356
- quinase(s), 360; 361
 - fosfo-serina/fosfotreonina proteínas fosfatases, 359
 - proteínas fosfatases estimuladas por Mg^{2+} , 359
 - serina/treonina quinases, 359
 - tirosinas quinases, 359
- região C-terminal, 204
- região N-terminal, 204
- reguladoras, 191; 389; 398
- remoção, 39
- residentes no RE, 204
- separação, 309; 310; 311; 316; 317; 318; 319; 321; 323
 - das proteínas
 - gel de poliacrilamida, 360; 362
 - filmes de raio-X, 250, 251, 252
 - autorradiografia, 360; 362; 363
- solubilidade, 41; 44; 207; 212; 213
- tamanho molecular, 207; 208; 210
- tecidos, 245
- totais, 217; 219; 220; 221; 223; 224; 225; 226; 227; 228; 229; 230; 232; 233
- transferência, 251; 255; 257
- transportadoras, 191
- Proteólise
 - prevenção da, 212
- Proteoma, 360
- Proteômica
 - análise MALDI-ToF linear, 316; 317; 318
 - ToF (*time of flight*), 314; 317
- Proteossomo, 203; 205
- Protozoário, 1
- Pseudópodo, 5
- Psoralenos, 126; 127
- Pulsos
 - altura, 283; 286
 - de voltagem, 283; 286
- Purificação de Glicoproteínas,
 - cromatografia, 353; 354; 355; 358
 - SDS PAGE, 354; 355
 - troca iônica, 354
 - α -metil-D-manosídeo, 352
 - exclusão molecular, 354; 355
- Purinas, 9; 10; 12
- Quantificação, 61; 63; 64; 65; 67; 83; 84; 87; 88; 94; 109; 111; 116; 117; 118
- Quimioluminescência, 30; 35; 236; 250; 366; 369; 370; 371
- Quimotripsina, 377
- Quinonas, 232
- Radiação, 218; 375; 388
 - ultravioleta, 125; 126; 193; 194
- Reação
 - de Griess, 366; 367
 - em cadeia da polimerase (PCR), 32, 42, 95, 95
 - aplicações, 97; 101; 106
 - contaminação, 104; 106
 - desnaturação, 95; 96; 98; 99; 102; 106
 - eficiência(s), 96; 98; 99; 100; 103; 104; 105
 - extensão, 95; 96; 98; 100; 101; 102; 103; 110; 111; 113; 182; 200; 204; 213; 283; 382
 - hibridação, 95; 95; 96; 97; 98; 99; 100; 101; 102; 103
 - otimização, 102; 106
 - PCR-*carryover*, 124
 - reagente(s), 98; 104
 - Taq DNA, 123
 - variações, 106
 - Klenow, 143
- Reagentes, 237; 238; 239; 240; 241
 - cromatogênicos, 360
 - fluorogênicos, 360
 - titulação, 231
- Reativo
 - de biureto, 225; 226; 227
 - de folin-ciocalteu, 230

- Receptores para esteroides, 399
 Receptores acoplados à proteína G, 354; 356
 Recomendações técnicas, 165
 Recuperação antigênica, 305; 306; 307
 Região
 gate, 284; 288
 promotora, 21; 22; 23
 regulatória, 389; 391
 Regiões-alvo, 169; 170; 173
 Relação sinal/ruído, 238
 Replicação, 12; 19; 20; 21; 27
 Réplica(s)
 biológicas, 75
 técnicas, 75
 Repórter fluorescente, 115; 116
 Repressão gênica, 157
 Reprodutibilidade, 118; 119; 220; 221
 Resina(s), 325; 326; 327; 328; 329; 329; 335; 340
 cromatográfica, 325; 326; 327; 328; 332; 335; 340;
 344; 348
 de sílica, 326; 329; 339; 340
 Ressonância paramagnética eletrônica, 366
 Resultado(s)
 falso(s) negativo(s), 79; 98; 239
 falso(s) positivo(s), 79; 80; 239
 Retículo endoplasmático, 3; 6; 8
 Ribonucleotídeo, 31
 Ribossomo(s), 2; 3; 4; 6; 15; 16; 17
 Ribozimas, 18; 19
 RM, 415; 416; 418; 419; 420; 421
 RNA, 2; 6; 7; 39; 41; 42; 43; 44; 45; 100; 103; 104; 105;
 106; 389; 398
 contaminante, 376
 detecção do sinal, 73; 76; 77
 extração, 75
 heteronuclear, (transcrito primário) 14; 22; 23
 hibridação, 73; 74; 76
 integridade, 75
 marcação, 73; 76; 77; 78; 80
 mensageiro, 14; 59; 70; 83; 157
 microRNA, 182
 mRNA, 59; 61; 64; 73; 78; 80; 131; 132; 182; 185;
 187
 pequenos RNA nucleares (snRNA), 14; 17; 18; 19;
 22; 25; 126; 171
 Polimerase, 21; 22; 23; 24; 32; 84; 87; 89; 100; 171;
 172; 183; 186; 389; 398
 quantificação, 185
 ribossômico, 14; 15; 16; 25
 RNase, 376
 RNAi, 167; 168; 169; 173
 RNase(s), 59; 60; 61; 67; 68; 69; 76; 83; 84; 89; 91;
 93; 94
 siRNA, 167; 168; 169; 170; 171; 172; 173; 174; 177
 total, 83; 84; 85; 87; 88; 90; 93
 transportador, 14
 RNase-H, 157; 158; 165
 RPA (Ensaio de Proteção à Ribonuclease, *Ribonuclease
 protection assay*), 83; 84; 87; 88; 93; 94
 RT-PCR, 87; 88
 DNA complementar (cDNA), 100; 103; 104; 105;
 106
 otimização, 102
 RNA mensageiro (mRNA), 104; 105; 106

 Safira sintética, 327
 Sais, 396
 Na₂SO₄, 41
 NaClO₄, 41
 NaF, 41
 NaSCN, 41
 sais de guanidina, 41
Salting-in, 207
Salting out, 44; 207
 acetato de amônio, 45
 acetato de sódio, 45
 cloreto de sódio, 45
 Saturação, 235
 SDS (sulfato de sódio dodecila), 56; 184; 186; 189; 208;
 212; 379
 PAGE, 48; 50; 51; 249; 255; 257; 261; 262; 273;
 274; 354; 355; 375; 376; 378; 379
 Seletividade, 220; 221; 328; 329; 335
 Sensibilidade, 109; 118; 119; 220; 221; 295; 296; 302;
 305
 Separação
 de cromossomos, 287
 de populações celulares, 284; 287; 291
 mecânica, 284
 por carga, 284
Sephadex, 85; 86; 89; 90
 Sequência sinalizadora, 204
 Sequenciamento, 167; 175; 176
 de novo, 314
Serial Analysis of Gene Expression, 131; 156
 Sexagem de espermatozoides, 287
 SH2, 361
 Silenciamento gênico, 167; 168; 173
 Sílica, 325; 326; 328; 329; 339; 340
 Sinais ópticos, 282; 283

- Receptores para esteroides, 399
 Receptores acoplados à proteína G, 354; 356
 Recomendações técnicas, 165
 Recuperação antigênica, 305; 306; 307
 Região
 gate, 284; 288
 promotora, 21; 22; 23
 regulatória, 389; 391
 Regiões-alvo, 169; 170; 173
 Relação sinal/ruído, 238
 Replicação, 12; 19; 20; 21; 27
 Réplica(s)
 biológicas, 75
 técnicas, 75
 Repórter fluorescente, 115; 116
 Repressão gênica, 157
 Reprodutibilidade, 118; 119; 220; 221
 Resina(s), 325; 326; 327; 328; 329; 329; 335; 340
 cromatográfica, 325; 326; 327; 328; 332; 335; 340;
 344; 348
 de sílica, 326; 329; 339; 340
 Ressonância paramagnética eletrônica, 366
 Resultado(s)
 falso(s) negativo(s), 79; 98; 239
 falso(s) positivo(s), 79; 80; 239
 Retículo endoplasmático, 3; 6; 8
 Ribonucleotídeo, 31
 Ribossomo(s), 2; 3; 4; 6; 15; 16; 17
 Ribozimas, 18; 19
 RM, 415; 416; 418; 419; 420; 421
 RNA, 2; 6; 7; 39; 41; 42; 43; 44; 45; 100; 103; 104; 105;
 106; 389; 398
 contaminante, 376
 detecção do sinal, 73; 76; 77
 extração, 75
 heteronuclear, (transcrito primário) 14; 22; 23
 hibridação, 73; 74; 76
 integridade, 75
 marcação, 73; 76; 77; 78; 80
 mensageiro, 14; 59; 70; 83; 157
 microRNA, 182
 mRNA, 59; 61; 64; 73; 78; 80; 131; 132; 182; 185;
 187
 pequenos RNA nucleares (snRNA), 14; 17; 18; 19;
 22; 25; 126; 171
 Polimerase, 21; 22; 23; 24; 32; 84; 87; 89; 100; 171;
 172; 183; 186; 389; 398
 quantificação, 185
 ribossômico, 14; 15; 16; 25
 RNase, 376
 RNAi, 167; 168; 169; 173
 RNase(s), 59; 60; 61; 67; 68; 69; 76; 83; 84; 89; 91;
 93; 94
 siRNA, 167; 168; 169; 170; 171; 172; 173; 174; 177
 total, 83; 84; 85; 87; 88; 90; 93
 transportador, 14
 RNase-H, 157; 158; 165
 RPA (Ensaio de Proteção à Ribonuclease, *Ribonuclease
 protection assay*), 83; 84; 87; 88; 93; 94
 RT-PCR, 87; 88
 DNA complementar (cDNA), 100; 103; 104; 105;
 106
 otimização, 102
 RNA mensageiro (mRNA), 104; 105; 106

 Safira sintética, 327
 Sais, 396
 Na₂SO₄, 41
 NaClO₄, 41
 NaF, 41
 NaSCN, 41
 sais de guanidina, 41
Salting-in, 207
Salting out, 44; 207
 acetato de amônio, 45
 acetato de sódio, 45
 cloreto de sódio, 45
 Saturação, 235
 SDS (sulfato de sódio dodecila), 56; 184; 186; 189; 208;
 212; 379
 PAGE, 48; 50; 51; 249; 255; 257; 261; 262; 273;
 274; 354; 355; 375; 376; 378; 379
 Seletividade, 220; 221; 328; 329; 335
 Sensibilidade, 109; 118; 119; 220; 221; 295; 296; 302;
 305
 Separação
 de cromossomos, 287
 de populações celulares, 284; 287; 291
 mecânica, 284
 por carga, 284
Sephadex, 85; 86; 89; 90
 Sequência sinalizadora, 204
 Sequenciamento, 167; 175; 176
 de novo, 314
Serial Analysis of Gene Expression, 131; 156
 Sexagem de espermatozoides, 287
 SH2, 361
 Silenciamento gênico, 167; 168; 173
 Sílica, 325; 326; 328; 329; 339; 340
 Sinais ópticos, 282; 283

- Sinalização intracelular
 atividade de proteínas quinases e/ou fosfatases, 361
 de fatores de crescimento, 359; 361
 de hormônios, 361
 influência de metabólitos, drogas ou outros fatores, 361
- Sinalizadores moleculares, 112; 113
- Sistema
 de amplificação, 109
 de registro ou de integração, 332
 detectores ópticos, 282
 eletrônico, 281; 282; 283; 286
 fluídico, 281; 282
 óptico, 281; 282; 283; 285; 286
- Síntese
 de RNA *in vitro*, 84
 protéica, 15; 16; 17; 19
- snRNP, 25; 27
- Solução(ões)
 de bloqueio, 239; 240
 de cobertura, 239
 de lavagem, 239; 240; 246; 344; 344
 preparo, 239
- Solvente(s), 325; 327; 328; 331; 332; 335; 336; 340; 344; 345; **347**
- SOM (mapas auto-organizacionais), 77; 79
- Sonda(s), 29; 30; 31; 32; 33; 34; 35; 36; 37; 38; 59; 62; 63; 64; 65; 66; 69; 70 71; 109; 110; 111; 112; 113; 114; 115; 116; 117; 119; 120
antisense, 83; 84; 87; 88; 89; 90
 de DNA, 391
 de hibridação, 35; 37
mismatch, 74
 radioativa(s), 83; 84; 181; 184; 185
 síntese, 83; 84; 85; 87; 88; 89; 90; 93
- Sonificação, 265
- Soroíneo, 224; 226; 227; 228; 229
- Southern Blotting*, 182
- Splincing*, 17; 18; 21; 22; 25; 27
- Spliceosome*, 25; 27
- Spots*, 309; 310; 311; 312
 processamento, 310; 311; 312; 316; 319
- Stripping*, 259
- Substratos
 fluorogênicos 238
 quimioluminescentes 238
- Sulfato de cobre penta-hidratado 226; 231
- SVM (*support vector machine*) 80
- Superóxido Dismutase 405; 406; 407; 408; 409
- SYBR[™] Green 49
- Tampão(ões)
 de eluição 208
 de extração 244; 245
 de reação 98
 detergentes iônicos 101
 de transcrição 87; 89
 fosfato de sódio (PBS) 243; 245
 sistema contínuo 55; 56
 sistema descontínuo 55
- Tartarato de sódio e potássio 225; 226; 231
- Tecido(s) 1; 7; 8; 293; 295; 297; 300; 301; 302; 303; 304; 305; 306
- Tecnologia *antisense* 157
- Telomerase 14; 18; 19
- Temperatura
 de desnaturação 115
 de Hibridação/Associação (T_a) 99
 de *Melting*/Dissociação (T_m) 41; 99
 fórmula 95
- Tempo de retenção 328; 340; 348; 349
- Termolisina 377
- Timina 10; 11; 12
- Tiocianato de guanidina 41
- Tirosina 365
- Topoisomerase I e II 12; 13; 21
- Titulação(ões) 237; 239
 automática 404
- TMB 239; 240; 241
- Toxicogenômica 81
- Transcrição 167; 171; 172; 175; 389; 391; 394; 398; 399; 400
- Transcrição *in vitro*
 DNA molde 84; 87
 reversa 18; 19; 76; 77
- Transcriptase Reversa 123
 RT 104
 propriedades 105
 termoestável 95; 96; 98; 106
- Transcriptoma 132; 135
- Transfecção 168; 170; 171; 172; 173; 176; 177
- Transferência 59; 62; 63; 64; 69
- Transições eletrônicas 218; 219
- Transmitância 220
- Trealose 106
- Tripsina 377; 378; 385; 388
- Tris-HCl 55
- Trizol 61; 66; 67; 75
- Ubiquitina 205
- Unicelular 1; 4; 5; 6; 7
- Uracila 10; 12
 N-glicosilase 126
- Ureia 41; 42; 51; 53

Vacúolo 4
Vantagens e desvantagens 225; 227; 230; 232; 233
Vetores 168; 169; 170; 171; 172
 espermidina 87
 T7 84; 85; 87; 89; 93
Volume morto 328; 332

Zona
 de equivalência 243
 de excesso de anticorpo 244
 de inibição 243

Western Blotting 249; 251; 252; 253; 366; 369
 preparo da amostra 246



Serviços de impressão e acabamento
executados, a partir de arquivos digitais fornecidos,
nas oficinas gráficas da EDITORA SANTUÁRIO
Fone: (0XX12) 3104-2000 - Fax (0XX12) 3104-2016
<http://www.editorasantuario.com.br> - Aparecida-SP